



# **Novos Produtos de Hortofrutícolas Fermentados**

**Susana Maria Jorge Silvério**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadora: Maria Luísa Lopes de Castro e Brito

Co-orientadora: Margarida Gomes Moldão Martins

## **Júri:**

Presidente: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.



Nunca imaginei que a minha dissertação tivesse como base uma bebida que foi uma presença constante numa altura de grande provação da vida da minha mãe.

Uma vez que ela estava numa luta com a doença dita da “moda” todas as sugestões que lhe eram apresentadas por familiares, amigos e conhecidos ela consentia em experimentar. Uma das sugestões, que não me lembro quem sugeriu, foi de beber sumo de beterraba todos os dias em jejum porque, segundo a pessoa, “A beterraba faz muito bem à saúde - “purifica o sangue”. No entanto, para tornar este sumo mais apelativo, devido ao sabor e cheiro a “terra” da beterraba, e em simultâneo para que possua um maior poder de cura, o ideal seria adicionar a este sumo, sumo de cenoura e sumo de maçã.

Esta bebida foi um “ritual” constante nos últimos anos da vida da minha mãe e também na minha. Todos os dias a minha mãe fazia este sumo, para ela e para mim, e era bebido em jejum. Afinal, não fazia mal a nada mas, sim, fazia bem a tudo.

Hoje em dia, este “ritual” mantém-se, no Verão.

**À minha mãe**

“Escuta o conselho e aceita a disciplina, para que te tornes sábio no teu futuro”

Prov. 19:20

## **Agradecimentos**

Agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Um agradecimento em especial à Professora Doutora Luísa Brito, minha orientadora, pela orientação e disponibilidade, pela paciência e acompanhamento do trabalho, pelas sugestões e críticas, pela amizade e carinho demonstrado.

À minha co-orientadora Professora Doutora Margarida Moldão, pela ajuda, motivação e incentivo demonstrado ao longo de todo o trabalho, pela amizade e carinho.

Agradeço a todas as pessoas do Laboratório de Microbiologia que trabalharam comigo no decorrer deste trabalho, em especial à Mestre Ana Carla Silva, pela disponibilidade, ajuda e por ter-me ensinado a trabalhar num laboratório, pela amizade e carinho ao longo do trabalho. Aos meus colegas mestrandos, em especial à Inês Oro, pela disponibilidade e amizade, à Virna Dutra e ao Hugo Santos. Aos mestres Paulo Firmino e Rute Coutinho, pela amizade, pelo apoio e disponibilidade. À doutoranda Paula Cunha pelos ensinamentos, conselhos e sugestões. Agradeço também às estagiárias Rita Custóias, Adelaide Sousa e Cátia Alves, pela participação nas avaliações sensoriais. Não podia deixar de agradecer à D. Lena e à D. Manuela, pelo carinho demonstrado, auxílio e disponibilidade.

Um agradecimento especial, à minha querida Mestre Viviana Monteiro, também pelo ensinamento, pela amizade, pelo apoio e motivação, pelas horas de boa disposição.

À doutoranda Joaquina Pinheiro, pela disponibilidade e auxílio na realização dos métodos para a determinação de antioxidantes e de fenóis totais e pela paciência com as minhas dúvidas e pelas sugestões, carinho e amizade.

À mestranda Tatiana Seixas, pela amizade e apoio prestado na realização dos métodos de determinação de açúcares.

Às minhas amigas e colegas que me acompanharam ao longo do percurso no ISA.

Ao meu pai, ao meu irmão, à minha avó Alice e à minha tia Marina que sempre estiveram presentes e me apoiaram incondicionalmente.

Ao meu namorado, Jorge Simões, pela presença constante, pelo apoio incondicional ao longo destes anos, pelo incentivo, motivação, amor e paciência. Também um agradecimento à sua família, em especial à sua mãe.

Obrigada a todos!

## Resumo

A Indústria Alimentar procura desenvolver novos produtos, que apresentem, em simultâneo, características de qualidade e de segurança alimentar e que respondam às necessidades dos consumidores.

O objectivo desta dissertação foi o desenvolvimento de três produtos derivados de hortofrutícolas fermentados por bactérias lácticas: uma bebida e dois molhos para salada.

Foram testadas 14 estirpes de bactérias lácticas em mono e/ou em co-cultura e o sumo de três hortofrutícolas, em várias combinações. Para a bebida, os melhores resultados foram obtidos a partir da fermentação da mistura dos sumos de beterraba, cenoura e maçã, por *Lactobacillus plantarum*. Nos molhos para salada, a fermentação de sumos de beterraba e de cenoura por *L. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* foi a que conduziu aos melhores resultados, e na fermentação de sumo de beterraba, o melhor resultado foi obtido com *Lactobacillus pentosus*.

Os três produtos atingiram às 24 horas de fermentação um valor de pH inferior e/ou igual a 4, o que contribuiu para a estabilidade microbiológica dos mesmos. Verificou-se uma redução de açúcares totais de cerca de 21% na bebida e entre 17 e 25% nos molhos. Para os três produtos, o valor final de bactérias lácticas foi cerca de 9 Log UFC/mL. No fermentado destinado a bebida, ao fim de 12 dias de refrigeração a 7 °C este valor era de 7 Log UFC/mL.

A análise sensorial mostrou que estes três produtos têm boa aceitabilidade de mercado ( $\geq 60\%$ ) e são os três potencialmente comercializáveis ( $\geq 65\%$ ).

**Palavras-chave:** Sumo de beterraba; sumo de cenoura; sumo de maçã; bebida fermentada; molho para salada; bactérias lácticas.

## **Abstract**

The Food Industry aims to develop new products, simultaneously, with quality and food safety characteristics, meeting the requirements of the consumers.

The aim of this thesis was the development of three products derived from fermented fruit and vegetables juices, by lactic acid bacteria.

Forteen strains of lactic acid bacteria in mono and/or co-culture were tested in the fermentation of the juices, in various combinations. For the beverage, the best results were obtained from the mixture of beet, apple and carrot juices, fermented by a strain of *Lactobacillus plantarum*. Fermentation of beet and carrot juices by *L. plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* was the one that led to the best results *another*, the best result was obtained for salad dressing. The fermentation of beet juice with *Lactobacillus pentosus* was another god result for salad dressing.

After 24 hours of fermentation, the three products reached a pH value lower than or equal to 4, which contributed to their microbiological stability. A reduction of total sugars of about 21% in the beverage and between 17 and 25% in the sauces was recorded. For the three products, the final value of lactic acid bacteria was approximately 9 log CFU/mL. For the fermented beverage, after 12 days of refrigeration at 7 °C, this value was 7 log CFU/mL.

Sensory analysis showed that these three products have good market acceptance ( $\geq 60\%$ ) and are potentially marketable ( $>65\%$ ).

**Key words:** Beet juice; carrot juice; apple juice; fermented beverage; salad dressings; lactic acid bacteria.

## Extended Abstract

The fruit and vegetables are natural sources of vitamins, minerals, antioxidants and fiber and are essential for the proper functioning of the human body. Their intake is vital in the prevention of diseases, whether they are simple colds or more serious illnesses.

The salad dressings contribute to a higher level of fat in the diet. The food industry has been making efforts to make these sauces healthier, producing varieties of salad dressings with new flavours and sauces that taste identically to traditional sauces, but with a reduced fat content.

The aim of this thesis was the development of three products derived from non alcoholic fermented juices of fruit and vegetables: a beverage and two salad dressings. The beverage had low sugar content and the salad dressings have natural acidity and low sugar and lipid content.

For this, we tested 14 strains of lactic acid bacteria in mono and/or co-culture and three juices of fruit and vegetables in various combinations. The strains used were available in CBISA (Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia). The juices were from beet, carrot and apple. These products were acquired in their original form, and subsequently processed into juice, on the premises of the Laboratory of Microbiology, of the Instituto Superior de Agronomia.

Fermentation of sugars provides various modifications of the characteristics of food and beverages. In general, fermented products have aroma, flavour and appearance attributes that are different from the raw materials from which they were made and become value-added products. Other properties make fermentation an important technology, such as the increase of the nutritional value of the fermented foods. Moreover, it provides an extra margin of safety and also an improved shelf-life.

As a result, a beverage resulting from the mixture of beet juice (10%), carrot juice (40%) and apple juice (50%) fermented by one strain of *Lactobacillus plantarum* was obtained. Two salad dressings were obtained: one constituted by the mixture of beet juice (20%) and carrot juice (80%) fermented by a co-culture of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* and the other dressing composed of beet juice (100%) fermented by one strain of *Lactobacillus pentosus*.

In the fermented products, the microbiological content, pH value, total sugars, reducing sugars, phenolic content, antioxidant activity and sensory characteristics (aroma and flavor) were monitorized.

In order to optimize the three fermented products, essential oil of *Mentha cervina* (1:50000) was added to beverage. Essential oil of oregano (1:50000), extracted in this work, and olive oil (1:5) were added to the products intended for salad dressings.

For the three products, the storage time was evaluated: beverage - 12 days; beet and carrot sauce - 18 days and beet sauce - 28 days. During these time periods, microbiological monitoring, as well as pH and sensory evaluation of flavor and aroma were carried on.

Subsequently, sensory analysis tests (32 people ages between 19 and 64 years) were performed and the results obtained showed that the acceptability of the three products was higher than 60% and the intent of purchase for the three products were higher than 65%, being the beet and carrot salad dressing the one that showed the higher intent of purchase (> 75%).



## Índice

1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.2. Bebidas fermentadas não-alcoólicas .....	3
1.3. Molhos para saladas.....	4
1.4. Fermentação .....	5
1.4.1. Fermentação láctica.....	6
1.4.1.1. Via homoláctica.....	6
1.4.1.2. Via heteroláctica .....	7
1.4.2. Fermentação de vegetais.....	8
1.5. Bactérias lácticas.....	11
1.5.1. <i>Lactobacillus</i> .....	12
1.5.2. <i>Leuconostoc</i> .....	14
1.6. Matérias-primas usadas na fermentação .....	14
1.6.1. Beterraba .....	14
1.6.2. Cenoura .....	16
1.6.3. Maçã Golden .....	17
1.6.4. Orégão .....	17
1.6.5. <i>Mentha cervina</i> .....	18
1.7. Funcionalidade dos hortofrutícolas.....	18
1.8. Objectivos do trabalho .....	20
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	21
2.1. Matérias-primas .....	21
2.2. Descontaminação e extracção dos hortícolas .....	22
2.3. Tratamentos térmicos .....	22
2.4. Estirpes de bactérias lácticas utilizadas .....	22
2.5. Condições de cultura e de manutenção das estirpes.....	23
2.6. Determinações microbiológicas e físico-químicas .....	23
2.6.1. Contagem de microrganismos totais a 30 °C.....	23
2.6.2. Contagem de bolores e leveduras .....	23
2.6.3. Contagem de <i>Bacillus cereus</i> .....	24
2.6.4. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito redutores .....	24
2.6.5. Bactérias lácticas em co-cultura.....	24
2.6.6. pH.....	24

2.6.7.	Teor de açúcares.....	24
2.6.7.1.	Método fenol-sulfúrico.....	25
2.6.7.2.	Método DNS.....	25
2.6.8.	Determinação de compostos fenólicos.....	26
2.6.9.	Determinação de actividade antioxidante.....	27
2.6.9.1.	Método DPPH.....	27
2.6.9.2.	Método FRAP.....	28
2.7.	Desenvolvimento de produtos fermentados.....	29
2.7.1.	Ensaio preliminares.....	29
2.7.2.	Produção dos sumos fermentados.....	30
2.7.2.1.	Bebida.....	30
2.7.2.2.	Molho de beterraba e cenoura para salada.....	30
2.7.2.3.	Molho de beterraba para salada.....	30
2.7.3.	Monitorização dos ensaios.....	30
2.8.	Formulação final dos produtos fermentados.....	31
2.9.	Avaliação do tempo de vida útil dos sumos e produtos fermentados.....	32
2.10.	Análise sensorial.....	32
2.11.	Análise estatística.....	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1.	Características microbiológicas dos hortícolas.....	34
3.2.	Tratamentos térmicos aplicados às matérias-primas.....	34
3.2.1.	Características microbiológicas dos sumos.....	34
3.2.2.	Valor de pH dos sumos.....	35
3.3.	Desenvolvimento de produtos fermentados.....	35
3.3.1.	Ensaio preliminares.....	35
3.3.2.	Ensaio de fermentação para obtenção de bebidas fermentadas.....	37
3.3.3.	Ensaio para obtenção de molhos fermentados para salada.....	38
3.3.3.1.	Molho de beterraba e cenoura.....	38
3.3.3.2.	Molho de beterraba.....	40
3.3.4.	Avaliação sensorial aos sumos fermentados.....	42
3.4.	Teor fenólico e actividade antioxidante.....	42
3.5.	Formulação dos produtos finais.....	47
3.6.	Avaliação do tempo de vida útil.....	48
3.6.1.	Sumos fermentados para obtenção de bebida e molhos para salada.....	48

3.6.2. Molhos para salada .....	53
3.7. Análise sensorial .....	58
4. CONCLUSÕES .....	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
ANEXOS .....	71

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1</b> - Microrganismos representativos da microbiota dos vegetais.....	9
<b>Quadro 2</b> - Exemplos de vegetais sujeitos a fermentação láctica produzidos em diferentes regiões do mundo.....	9
<b>Quadro 3</b> - Composição média da beterraba e da cenoura (% da parte edível fresca) .....	16
<b>Quadro 4</b> - Vitaminas e ácidos orgânicos presentes na beterraba e na cenoura (mg/100 g de massa fresca) .....	16
<b>Quadro 5</b> - Minerais mais representativos presentes nas matérias-primas (mg/100 g de massa fresca) .....	17
<b>Quadro 6</b> – Hidratos de carbono presentes nas matérias-primas (por 100 g de alimento edível) .....	17
<b>Quadro 7</b> - Estirpes de bactérias lácticas testadas.....	22
<b>Quadro 8</b> - Resultados relativos aos valores de pH para os sumos de beterraba, de cenoura e de maçã com e sem tratamentos térmicos.....	35
<b>Quadro 9</b> - Resultados da avaliação sensorial e do valor de pH na mistura de sumo de beterraba, cenoura e maçã (10%, 40% e 50% respectivamente) fermentados. ....	36
<b>Quadro 10</b> - Resultados da avaliação sensorial e do valor de pH da mistura de sumo de beterraba e de cenoura (1:5) fermentadas por co-culturas .....	36
<b>Quadro 11</b> - Resultados da avaliação sensorial e do valor de pH do sumo de beterraba fermentado. ....	37
<b>Quadro 12</b> - Monitorização dos valores de açúcares totais e açúcares redutores, nos três sumos fermentados. ....	41
<b>Quadro 13</b> - Avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenagem, do fermentado para bebida, esterilizado e não esterilizado, após fermentação .....	49
<b>Quadro 14</b> - Avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenagem, do fermentado de beterraba e cenoura para molho, esterilizado e não esterilizado, após fermentação .....	49
<b>Quadro 15</b> - Avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenagem, de fermentados de beterraba para molho, esterilizado e não esterilizado, após fermentação.....	50
<b>Quadro 16</b> - Avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenagem, relativo ao produto final molho de beterraba e cenoura para salada esterilizado e não esterilizado, após fermentação .....	55

<b>Quadro 17</b> - Avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenagem, relativo ao produto final molho de beterraba para salada esterilizado e não esterilizado, após fermentação.....	56
--	----

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da via Embden-Meyerhoff utilizada por bactérias lácticas homofermentativas .....	7
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da via heteroláctica utilizada por bactérias lácticas heterofermentativas .....	8
<b>Figura 3</b> - Estrutura geral: <b>a)</b> Betalaína, <b>b)</b> Betacianinas, (I- Betanidina e II- Isobetanidina) e <b>c)</b> Betaxantina, (I e II Vulgaxantinas) .....	15
<b>Figura 4</b> - Obtenção de óleo essencial de orégãos por destilação.....	21
<b>Figura 5</b> - Curva de calibração do método fenol-sulfúrico.....	25
<b>Figura 6</b> - Curva de calibração do método DNS.....	26
<b>Figura 7</b> - Curva de calibração para a determinação de compostos fenólicos .....	27
<b>Figura 8</b> - Curva de calibração do método DPPH .....	28
<b>Figura 9</b> - Curva de calibração do método FRAP .....	29
<b>Figura 10</b> - Visualização da aparência das três amostras seleccionadas para continuação do trabalho .....	31
<b>Figura 11</b> - Monitorização dos valores de pH e Log UFC/mL em sumo fermentado por <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	38
<b>Figura 12</b> - Monitorização dos valores de pH e Log UFC/mL, em sumo de beterraba e cenoura fermentado por <i>Lactobacillus plantarum</i> e/ou <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , para obtenção de molho para salada.....	39
<b>Figura 13</b> - Monitorização dos valores de pH e Log UFC/mL em sumo de beterraba fermentado por <i>Lactobacillus pentosus</i> para obtenção de molho para salada. ....	40
<b>Figura 14</b> - A - Teor fenólico (ácido gálico (mg/L)) e B- capacidade antioxidante ( $\mu$ M Trolox), nos cinco sumos fermentados. ....	44
<b>Figura 15</b> - Diferença de cor entre fermentados destinados a bebida, no 1º dia de armazenagem .....	51
<b>Figura 16</b> - Diferença de cor entre os fermentados destinados a molhos para salada, no 1º dia de armazenagem.....	51
<b>Figura 17</b> - Avaliação da estabilidade, em armazenagem, a 7 °C, do fermentado para bebida e dos fermentados para molhos. ....	52
<b>Figura 18</b> - Visualização de cor do produto final no 1º dia de armazenagem .....	54
<b>Figura 19</b> - Atributos sensoriais da bebida e dos molhos fermentados .....	58
<b>Figura 20</b> - Apreciação global da bebida e dos molhos fermentados .....	59
<b>Figura 21</b> - Intenção de compra dos três produtos .....	60

<b>Figura 22 -</b> Projecção dos atributos sensoriais (A) e dos produtos (B) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.....	61
---	----

## 1. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

### 1.1. Introdução

A Indústria Alimentar ao longo dos últimos anos tem apresentado uma grande evolução tecnológica e científica, com impacto no desenvolvimento e inovação. Em parte, esta evolução foi potenciada pela maior consciencialização do consumidor e pela globalização. Neste sentido, esta Indústria está focada no desenvolvimento de novos produtos que apresentem, em simultâneo, características de qualidade, segurança alimentar e que respondam à procura dos consumidores.

O consumidor actual tem cada vez menos tempo disponível para preparar refeições saudáveis, menos aptidão para a culinária, maior poder de compra e simultaneamente, está cada vez mais consciente e mais conhecedor relativamente à importância de uma alimentação equilibrada tendo como consequência, uma maior exigência de qualidade e preocupação com aquilo que consome.

Os hortofrutícolas são fontes naturais de vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras e são essenciais para o bom funcionamento do organismo humano. A sua ingestão é fundamental na prevenção de doenças, quer sejam simples constipações ou doenças mais graves.

É notória a crescente procura por hortofrutícolas funcionais, a chamada “moda dos antioxidantes”. As pessoas procuram consumir alimentos com cor forte, nomeadamente os frutos vermelhos e hortícolas como a cenoura e a beterraba, por conhecerem os seus benefícios para a saúde. Estes, não só têm efeito no atraso do envelhecimento como, previnem o aparecimento de doenças degenerativas. Muitos hortofrutícolas caracterizam-se ainda por apresentarem elevados teores de açúcares solúveis, facilmente assimiláveis, o que pode constituir problema para alguns grupos de consumidores.

A fermentação dos açúcares solúveis, para além de obviar a referida questão, proporciona várias modificações das características dos alimentos, sendo que a preservação dos mesmos foi uma das principais razões a ditar a integração deste tipo de alimentos na dieta alimentar (Lee, 1997; Hutkins, 2006). A utilização de microrganismos específicos nos alimentos, nomeadamente bactérias lácticas que produzem agentes antimicrobianos específicos, fornece uma margem extra de segurança e também um maior tempo de prateleira. Mas outras propriedades fazem da fermentação uma tecnologia importante, tal como o aumento do valor nutricional



dos alimentos fermentados. É o caso do leite: as pessoas que sejam intolerantes à lactose, devido à incapacidade de produção da  $\beta$ -galactosidase, que degrada a lactose, têm como alternativa o iogurte. Este produto resulta da fermentação da lactose, sendo possível consumi-lo sem qualquer sintoma desagradável, conseguindo obter os benefícios nutricionais contidos no leite, o que não seria possível, caso o leite não fosse fermentado. Outra propriedade notória da fermentação é a nível organoléptico. Em geral, os produtos fermentados possuem aroma, sabor e aparência que são diferentes das matérias-primas a partir das quais foram feitos. Cerveja, vinho, queijo curado, salame e *choucroute* são exemplos de bebidas e alimentos fermentados. Pelas características desenvolvidas, os alimentos fermentados são produtos de valor acrescentado. Por exemplo, o leite após ser inoculado e manipulado, ao fim de algum tempo pode resultar num queijo que vai ter um custo bem acima da matéria-prima inicial (Hutkins, 2006).

A fermentação ocorre pela utilização de microrganismos, como é o caso das bactérias lácticas (Leroy & Vuyst, 2004). Esta pode iniciar-se de forma natural ou induzida através da adição de microrganismos, normalmente chamados de culturas *starter* (Leroy & Vuyst, 2004; Hutkins, 2006), isto é, culturas de microrganismos que dão início às fermentações. As culturas *starter* normalmente utilizadas em fermentações lácticas, foram isoladas a partir de fermentações de produtos hortícolas, como é o caso de *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus brevis* (Hutkins, 2006). A utilização deste tipo de culturas é recomendado do ponto de vista da qualidade e segurança alimentar, uma vez que a utilização destas bactérias leva a uma rápida acidificação do produto e inibe o crescimento de bactérias patogénicas e seus esporos (Rodríguez *et al.*, 2009). A selecção de culturas *starter* deve ter em conta o alimento a fermentar e as características que se pretende que o alimento fermentado venha a apresentar.

Além disso, a escolha de bactérias lácticas para a fermentação deve ter em conta as propriedades destes microrganismos, tais como capacidade de crescer a baixas temperaturas, capacidade de fermentar diversos açúcares, capacidade de produzir sabor desejável, rápido crescimento e produção de ácido, tolerância a baixos valores de pH (Hutkins, 2006; Di Cagno *et al.*, 2008) e perda mínima de viabilidade durante a armazenagem, entre outros factores (Hutkins, 2006).

A utilização deste tipo de bactérias tem sido uma realidade em crescimento, devido às suas diversas propriedades e aplicações. Estas bactérias são capazes de produzir substâncias antimicrobianas (incluindo ácidos orgânicos), polímeros de açúcares,

compostos aromáticos, enzimas úteis e conferem propriedades benéficas à saúde, podendo ser probióticas. Estes factores proporcionam a substituição de alguns aditivos por estas bactérias e conduzem a uma ampla gama de aplicações (Leroy & Vuyst, 2004).

### **1.2. Bebidas fermentadas não-alcoólicas**

O desenvolvimento de alimentos fermentados, incluindo as bebidas fermentadas, resulta em vários benefícios. Para que a fermentação ocorra da maneira prevista, deve-se ter em conta alguns aspectos que devem ser previamente considerados, como o tipo de matéria-prima a fermentar, a cultura *starter* a utilizar e as condições de fermentação.

O exemplo mais conhecido de uma bebida fermentada não alcoólica é o iogurte, em que são utilizadas geralmente, duas bactérias lácticas *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Outro exemplo são os diversos tipos de leites fermentados, em que se utiliza apenas uma bactéria láctica ou em que se conjugam mais do que uma.

Entretanto, ao longo dos anos, outras bebidas fermentadas não alcoólicas têm vindo a surgir. É o caso de sumos fermentados à base de polpa de fruta e de hortícolas. Os *smoothies* são batidos que surgem como alternativa e/ou complemento de produtos frescos. Surgiram pela primeira vez em 1960 nos EUA. A produção destes batidos baseia-se na mistura de polpa de fruta e de hortícolas após a remoção de sementes e cascas. A mistura de hortofrutícolas é baseada na cor, no sabor e na textura. Um exemplo de *smoothie* consiste na junção de sumo de uva branca e extracto de aloé vera misturados com frutos ou vegetais, de cor vermelha ou verde, para dar cor, e submetidos a uma fermentação, em co-cultura por *L. plantarum*, *Weissella cibaria* e *Lactobacillus pentosus*. O resultado obtido foi positivo a nível de antioxidantes e aumento de atributos sensoriais (Di Cagno *et al.*, 2013).

Outro exemplo de bebidas fermentadas à base de hortofrutícolas, que têm ganho popularidade é o sumo fermentado de beterraba, o qual é fermentado por bactérias lácticas probióticas como *Lactobacillus acidophilus* LA 39 ou *L. plantarum* C3. Além de ser uma bebida com as propriedades nutricionais da matéria-prima e da fermentação, ao ser fermentado por estas estirpes, passa também a ser um sumo probiótico, isto é, estas bactérias tem a capacidade de colonizar e proliferar no tracto intestinal humano prevenindo o crescimento de patogénios (Yoon *et al.*, 2005). A produção de sumo de cenoura fermentado também é uma realidade. É dos sumos de hortícolas mais populares e a fermentação por *L. plantarum*, por exemplo, resulta num sumo muito

agradável, com alto valor nutricional e microbiologicamente mais estável (Demir *et al.*, 2006).

O aumento do consumo de bebidas fermentadas não lácteas deve-se por um lado aos vários benefícios que contribuem para a saúde do consumidor, a uma grande estabilidade de armazenagem e, também, ao aumento da prevalência de pessoas intolerantes à lactose.

### **1.3. Molhos para saladas**

Não tendo conhecimento que exista uma definição de molhos para salada, na Legislação Portuguesa, usou-se como base o Decreto-lei do Brasil, RDC n.º 276 de 22 Setembro de 2005, o qual define molhos do seguinte modo: “São os produtos em forma líquida, pastosa, emulsão ou suspensão à base de especiaria (s) e ou tempero (s) e ou outro (s) ingrediente (s), fermentados ou não, utilizados para preparar e ou agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas”.

Os molhos para salada contribuem com um elevado nível de gordura na dieta alimentar. A Indústria Alimentar tem desenvolvido esforços no sentido de tornar estes molhos mais saudáveis, produzindo variedades de molhos para salada com novos sabores e molhos que possuam o sabor idêntico aos molhos tradicionais, mas com teor reduzido de gordura.

Neste contexto, têm surgido novos molhos para salada. Existem empresas nacionais que têm respondido a esse desafio. É o caso das empresas Vitacress e Mendes Gonçalves. A inovação surgiu no sentido de misturar polpas de fruta fresca e até mesmo pedaços de fruta ao vinagre. Inovaram no sentido de não ser um vinagrete clássico. Em vez da junção do vinagre ao azeite, juntaram o vinagre à polpa de fruta. Tornaram assim este tipo de produto mais saudável e agradável, até para quem não gosta de vinagre. As características do vinagre são mascaradas pela doçura da polpa de fruta. No caso da empresa Mendes Gonçalves esta inovação pertence à gama *gourmet* da Creative.

Neste sentido, a produção de molhos para salada, fermentados à base de polpa de hortícolas surge como uma hipótese pertinente e de acordo com as tendências actuais. Assim, consegue-se obter um molho para salada isento ou com pouca gordura, a que se juntam os benefícios nutricionais e funcionais que os hortofrutícolas possuem, e os benefícios da fermentação.

### **1.4. Fermentação**

A fermentação remonta aos primórdios do Homem que, inevitavelmente, consumia alimentos fermentados, não por ter planeado, mas sim porque os alimentos que utilizava, visto não terem qualquer conservante, resultavam em alimentos fermentados. É o caso do leite que, ao ser retirado do animal, teria de ser consumido imediatamente, ou então ao fim de algumas horas, uma vez que azedava e ficava coalhado ou, então, simplesmente ficava putrefato. O mesmo acontecia ao sumo de uvas e de outros frutos, inicialmente doces, ao fim de alguns dias tornava-se uma bebida inebriante – o vinho (Hutkins, 2006).

Através destas ocorrências, os primeiros humanos deram conta que a transformação que ocorria nos alimentos tornava-os organolepticamente diferentes, e passaram a apreciá-los por isso. Ao mesmo tempo, todos os alimentos fermentados como o leite, o queijo e o vinho tornaram-se menos perecíveis e mais seguros para consumo, do que as matérias-primas que lhes deram origem.

Existem várias passagens na Bíblia que falam de alimentos fermentados, o que mostra que este tipo de alimentos já era conhecido pelas culturas e civilizações que viveram durante o tempo em que a Bíblia foi escrita. Por exemplo, em Genesis (9:20-21) é mencionado que Noé bebeu vinho até se embriagar (“Noé, que era agricultor, começou a lavrar a terra e plantou a primeira vinha. Tendo bebido vinho, embriagou-se...”). Outro exemplo está registado em Êxodo (12:39), e talvez seja a referência à fermentação mais importante. Ocorre na altura da Páscoa e é mencionado que começaram a cozer pães ázimos, pois a massa não estava fermentada (“Cozeram a massa que tinham levado do Egito e fizeram pães ázimos pois a massa não estava fermentada...”). Outra referência importante à fermentação está em João 2:9-10 (“...O chefe de mesa depois de provar a água transformada em vinho, como não sabia de onde viera,...chamou o noivo, e disse-lhe: “Toda a gente serve primeiro o vinho bom, e, quando os convidados tiverem bebido bem, serve então o pior....”. Outras referências a alimentos fermentados surgem na mitologia Ocidental e Oriental (Hutkins, 2006).

No entanto, muitos anos passaram desde a descoberta de alimentos fermentados até os humanos conseguirem controlar as condições para a produção consistente de alimentos fermentados.

Até meados do século XIX, a comunidade científica acreditava na geração espontânea. Mas foi Kützing Schwann que observou células de levedura em produtos líquidos de fermentação, incluindo vinho e cerveja. Estas observações, em 1837,

levaram-no a sugerir que é a partir do desenvolvimento de leveduras que a fermentação começa. No entanto, foi só em 1857 que Louis Pasteur concluiu que a fermentação só ocorre se estiverem presentes os microrganismos e que, durante a fermentação, os microrganismos se multiplicam (Hutkins, 2006).

Uma vez estabelecida a base científica da fermentação, as etapas seguintes foram no sentido da identificação de microrganismos e estirpes para utilização em fermentações específicas (Hutkins, 2006).

#### **1.4.1. Fermentação láctica**

A fermentação láctica é relativamente rápida, o rendimento obtido é elevado e conduz a um dos dois isómeros de ácido láctico ou à sua mistura (Martinez *et al.*, 2013). A fermentação inicia-se através da presença de bactérias lácticas, que são seleccionadas de acordo com a capacidade de produção de ácido láctico e outros produtos. Esta produção de ácido láctico e outros produtos finais do metabolismo das bactérias é a chave para a obtenção de produtos com características sensoriais mais apelativas e de boa preservação. No decorrer da fermentação, o ácido láctico produzido funciona como estabilizante e também como produto final durante o processo. Visto que diminui o valor de pH da matéria-prima (Hutkins, 2006).

A fermentação pode seguir duas vias: a homoláctica, na qual o ácido láctico é o produto maioritariamente formado (mais de 90%) e a via heteroláctica, na qual se formam outros produtos além do ácido láctico, como ácido acético, etanol, dióxido de carbono, entre outros. Assim, dependendo da espécie a ser utilizada, podem ocorrer vias metabólicas diferentes (Hutkins, 2006).

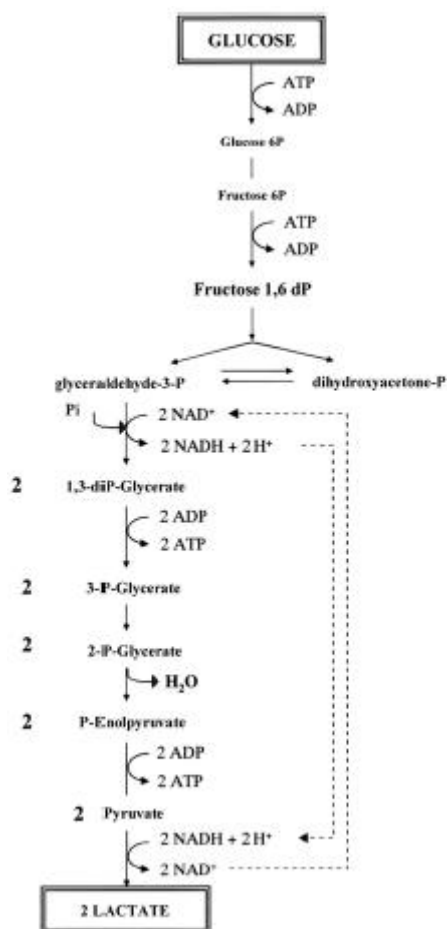
Em geral, os produtos resultantes das duas vias variam com a duração do processo de fermentação, do tipo e da concentração do substrato, da temperatura de crescimento, das condições ambientais e da fase de crescimento das células (Hutkins, 2006).

Muitos são os produtos obtidos por fermentação láctica, desde os vegetais, aos leites fermentados, iogurtes, *kefir*, queijos, arroz cozido, peixe cru, entre outros (Steinkraus, 1997).

##### **1.4.1.1. Via homoláctica**

Na via homoláctica (figura 1), o processo ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, chamada via Embden-Meyerhoff, a glucose é convertida em ácido pirúvico, na segunda etapa, o ácido pirúvico é reduzido a ácido láctico, pelo poder redutor anteriormente produzido na forma de NADH. Nesta via, o ácido láctico é o único produto obtido pelo consumo de glucose (Lahtinem *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2013).

As bactérias lácticas que somente utilizam esta via para a fermentação, são chamadas de homofermentativas obrigatórias (Hutkins, 2006; Martinez *et al.*, 2013).



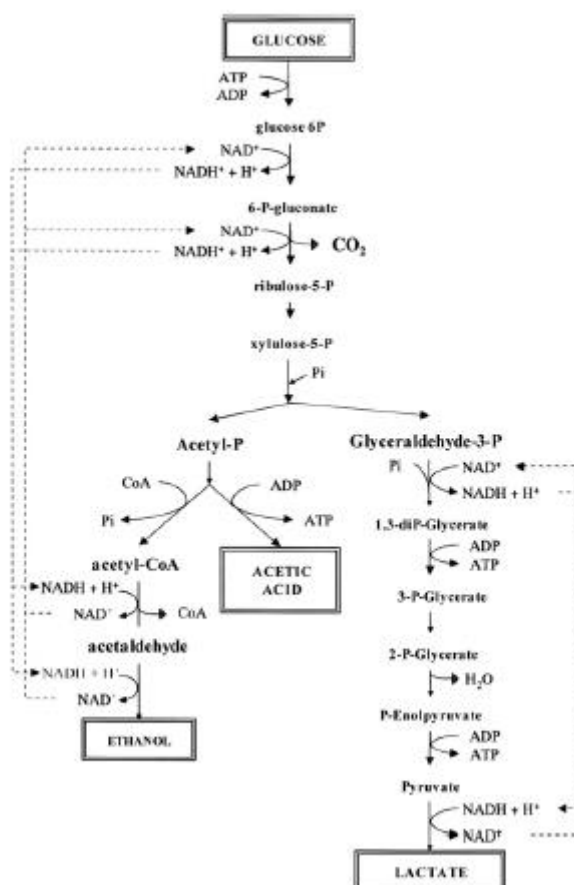
**Figura 1** - Representação esquemática da via Embden-Meyerhoff utilizada por bactérias lácticas homofermentativas (Fonte: Martinez *et al.*, 2013).

#### 1.4.1.2. Via heteroláctica

Na via heteroláctica (figura 2) a glucose é degradada pela via das pentoses-fosfato, na qual se forma o gliceraldeído-3-fosfato, o acetil-fosfato e o dióxido de carbono. É através do gliceraldeído-3-fosfato que a glucose é convertida em ácido láctico, enquanto que o acetil-fosfato é convertido em ácido acético e/ou etanol (Lahtinem *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2013).

As bactérias lácticas que utilizam esta via, para consumo dos açúcares fermentescíveis, são chamadas de heterofermentativas obrigatórias.

A maioria das bactérias lácticas utilizadas nas fermentações alimentares são heterofermentativas.



**Figura 2** - Representação esquemática da via heteroláctica utilizada por bactérias lácticas heterofermentativas (Fonte: Martinez *et al.*, 2013).

#### 1.4.2. Fermentação de vegetais

A produção de vegetais fermentados, provavelmente, evoluiu de uma simples salga de legumes, visto que a salga de legumes para conservação era prática corrente há milhares de anos. O sal adicionado à matéria-prima fresca tinha como função conservar o produto, que depois era devidamente embalado e conservado à temperatura ambiente. Caso a incorporação de sal no produto não fosse em concentração suficiente, estavam reunidas as condições necessárias para o crescimento natural de bactérias lácticas. A fermentação que se seguia podia então aumentar o período de conservação do legume e dar origem a um aroma e sabor característicos da fermentação que acabaram por se tornar desejáveis (Hutkins, 2006).

A tecnologia da fermentação de vegetais tem o mesmo princípio que as outras fermentações lácticas. O açúcar é convertido em ácido e o produto final tem características diferentes, mas agradáveis. Porém, para a produção de produtos lácteos, como o iogurte e o queijo, é necessário adicionar uma cultura *starter* para se dar início à fermentação. No caso da fermentação de alguns vegetais, a fermentação

depende da microbiota natural dos mesmos. Neste tipo de fermentação existe uma ampla variedade de bactérias lácticas responsáveis pela fermentação, que incluem heterofermentativas e/ou homofermentativas. No entanto, a microbiota dos vegetais é muito variada (Quadro 1). Por esse motivo, para ocorrer a fermentação láctica de vegetais é necessário ter em conta certos factores tais como o sal, a temperatura e um ambiente de anaerobiose (Hutkins, 2006).

**Quadro 1** - Microrganismos representativos da microbiota dos vegetais

Aeróbios	Bactérias Lácticas	Enterobacterias	Leveduras e Bolores
<i>Pseudomonas</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Pediococcus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Tetragenococcus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Escherichia</i>	<i>Fusarium</i> <i>Ascochyta</i> <i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Rhodotorula</i>

(Adaptado de: Hutkins, 2006)

No quadro 2, apresentam-se exemplos de vegetais fermentados produzidos em diferentes regiões do mundo.

**Quadro 2** - Exemplos de vegetais sujeitos a fermentação láctica produzidos em diferentes regiões do mundo

Produto	Região	Ingredientes	Bactérias lácticas envolvidas
<i>Choucroute</i>	Alemanha, Europa, EUA	Couve, sal	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Kimchi</i>	Coreia	Couve chinesa, rabanete, outros vegetais, sal	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuc. kimchii</i> , <i>Leuc. citreum</i> , <i>Leuc.gasicomitatum</i> , <i>Leuc.</i> <i>pseudomesenteroides</i>
<i>Dhamuoi</i>	Vietnam	Couve, vários vegetais	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Dakguadong</i>	Tailândia	Folha de mostarda, sal	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Burong mustala</i>	Filipinas	Folha de mostarda	<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus cerevisiae</i>

(Adaptado de: Lee, 1997; Karovicová & Kohajdová, 2003; Hutkins, 2006; Di Cagno *et al.*, 2013)

A couve é o vegetal mais utilizado como substrato para fermentações. Na Alemanha, a couve é transformada através da fermentação em *choucroute*. Para a obtenção deste fermentado é necessário couve e sal, entre 2 a 2,5%, sendo o ideal 2,25% (Steinkraus,



1997; Karovicová & Kohajdová, 2003; Hutkins, 2006). Usualmente, é escolhida a couve branca, visto ser mais leve e ligeiramente adocicada e possuir 5%, ou mais, de açúcares fermentescíveis (Hutkins, 2006).

A fermentação láctica na *choucroute* segue uma série de etapas que se sobrepõem e que envolvem bactérias lácticas heterofermentativas e homofermentativas (Gardner *et al.*, 2001; Kohajdová & Karovicová, 2003; Hutkins, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009). A primeira etapa é marcada pelo crescimento de *Leuc. mesenteroides*. Este microrganismo converte principalmente os açúcares, glucose e frutose, em ácido láctico, ácido acético, manitol (Gardner *et al.*, 2001), CO<sub>2</sub> e etanol. O meio ácido criado pelo crescimento desta bactéria, favorece a inibição de microrganismos não lácticos, bem como a produção de ácido láctico por outras bactérias lácticas. Quando a concentração de ácido láctico é cerca de 1%, o próprio ácido láctico produzido por *Leuc. mesenteroides* inibe-o e inicia-se a segunda etapa, na qual começa a dominar outro tipo de bactérias lácticas, primeiro *L. brevis* e em seguida *L. plantarum* (Steinkraus, 1997; Hutkins, 2006). Estas bactérias produzem mais ácido láctico, até cerca de 1,6%. A fermentação termina, após um a dois meses, quando a concentração de ácido láctico atinge cerca de 1,7% e o pH valores entre 3,4 e 3,6. São os produtos finais obtidos pelo desenvolvimento de bactérias heterofermentativas, como o *Leuc. mesenteroides*, e homofermentativas, como *L. plantarum*, que são essenciais para o sabor característico da *choucroute* (Hutkins, 2006).

Na Coreia do Sul, é utilizada couve chinesa misturada com pimentos vermelhos, rabanetes, alhos e outros legumes (Hutkins, 2006; Di Cagno *et al.*, 2013) para fazer uma versão picante da *choucroute* - o *kimchi*. A principal diferença é que o *kimchi* contém mais ingredientes que podem ser não só outros legumes, como também camarões, nozes e peixe, especiarias e aromatizantes e isso tem como consequência características mais pronunciadas de sabor e de textura. O *kimchi* é o alimento fermentado mais popular na Coreia. É comum comer *kimchi* a cada refeição, durante todo o ano. O consumo equivale a 120 g por dia, o que representa 43 kg anuais (Hutkins, 2006). O *kimchi* foi incluído na lista *top 5* dos “Alimentos mais Saudáveis do Mundo” (Di Cagno *et al.*, 2013). Os benefícios são atribuídos aos componentes funcionais da matéria-prima (Di Cagno *et al.*, 2013) e aos produtos resultantes da fermentação (Hutkins, 2006; Di Cagno *et al.*, 2013).

Os vegetais fermentados têm tido um papel muito importante na dieta alimentar do Ocidente, Médio Oriente e Oriente, não só pela conservação, textura e sabor agradáveis mas também pelas propriedades nutricionais obtidas. A *choucroute* é

conhecida pelas suas propriedades anti-escorbuto, devido à elevada quantidade de vitamina C contida na couve. No período das Descobertas, foi um produto essencial para os marinheiros, que tinham pouco acesso a hortofrutícolas frescos. Já o *kimchi* está associado à redução da incidência de várias doenças entre a população coreana. É o caso da redução de cancro gástrico pelo consumo de *kimchi* feito a partir de vegetais com baixo teor de nitratos (Hutkins, 2006).

Os *pickles* e as azeitonas, constituem exemplos de vegetais fermentados produzidos e comercializados um pouco por todo o mundo.

O vegetal mais associado aos *pickles* é o pepino, embora possam ser outros vegetais ou frutas. As etapas de processamento de *pickles* são idênticas na produção de *choucroute*. É necessária a adição de sal e um ambiente anaeróbio para a selecção e o crescimento natural das bactérias lácticas (Hutkins, 2006).

De realçar que nem todos os *pickles* são comercializados como vegetais fermentados com características sensoriais devidas ao ácido láctico, pois muitas vezes, são comercializados e conservados em ácido acético.

Quanto às azeitonas, existem dois tipos fermentados: azeitona verde tipo Espanhola e azeitona preta tipo Grega. As diferenças entre estes dois tipos de azeitona são evidentes, a começar pela cor e grau de maturação da matéria-prima, pelo processamento e também pelo tipo de fermentação. Na fermentação da azeitona tipo Espanhola, ocorrem três etapas de fermentação, a primeira etapa deve-se à presença de várias bactérias Gram positivas e Gram negativas, nos primeiros dois a quatro dias, especialmente quando a quantidade de sal é baixa. A segunda etapa de fermentação é dominada por *Leuc. mesenteroides* e *Pediococcus* sp. e a última etapa, ao fim de duas a três semanas, por *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. fermentum* e outros *Lactobacillus*. No entanto é *L. plantarum* que domina esta última etapa.

No caso das azeitonas tipo Grega, colhidas em estado de maturação mais avançado, a fermentação é efectuada sobretudo por leveduras (Hutkins, 2006).

### **1.5. Bactérias lácticas**

As bactérias lácticas, ou bactérias do ácido láctico, são definidas como um grupo de bactérias produtoras de ácido láctico, embora este termo não seja o oficial na taxonomia, mas sim descreva a funcionalidade deste grupo.

A primeira cultura pura destas bactérias foi denominada por “*Bacterium lactis*” (Salminen & Wrigth, 1998).

A nível taxonómico, consistem em 12 géneros, dos quais sete (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Tetragenococcus*) são usados directamente em fermentações de alimentos (Hutkins, 2006). Todos pertencem ao filo *Firmicutes* (Hutkins, 2006; Lahtinem *et al.*, 2012), classe *Bacilli* (Lahtinem *et al.*, 2012) e à ordem *Lactobacillales* (Hutkins, 2006; Lahtinem *et al.*, 2012). Esta ordem é ainda subdividida em seis famílias: *Streptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Aerococcaceae* e *Enterococcaceae* (Lahtinem *et al.*, 2012).

Quanto à sua caracterização estas bactérias são: gram-positivas, de catalase negativa, não esporoladas, anaeróbias facultativas, são capazes de realizar a fermentação tanto em anaerobiose como em aerobiose e são ácido tolerantes. Morfologicamente são um grupo heterogéneo. Possuem forma de bastonetes ou de cocos que podem estar dispostos em cadeia ou isolados e não são móveis (Salminen & Wrigth, 1998; Hutkins, 2006). Diferem de outras bactérias também produtoras de ácido láctico, como por exemplo *Bacillus*, *Listeria* e *Bifidobacterium*, por numerosas diferenças fenotípicas e genotípicas (Hutkins, 2006). Além disso, em termos de necessidades energética e de carbono são heterotróficas e quimioorganotróficas (Salminen & Wrigth, 1998; Lahtinem *et al.*, 2012), isto é, necessitam de carbono orgânico pré-formado como fonte de carbono e de energia.

As bactérias lácticas são mesófilas, havendo algumas linhagens termófilas. São capazes de crescer num intervalo de valores de temperatura de 5 a 45 °C e em meios com pH ácido, cerca de 3,8 (Salminen & Wrigth, 1998).

A principal razão pela qual este tipo de bactérias são usadas na fermentação de alimentos, deve-se à capacidade destas em metabolizar os açúcares e, em simultâneo, de produzir ácido láctico e outros produtos secundários. Como já foi referido anteriormente, existem as bactérias heterofermentativas, as homofermentativas e as heterofermentativas facultativas (Hutkins, 2006).

Os géneros de bactérias lácticas utilizadas neste trabalho são dois: *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

#### **1.5.1. *Lactobacillus***

O género *Lactobacillus* é composto por mais de 80 espécies. É o género de bactérias lácticas que contem mais espécies, além de ser o mais diverso, a nível ecológico, fisiológico, bioquímico e genético. Encontram-se espécies de *Lactobacillus* em diversos habitats, excepto nos mais extremos. A presença destas bactérias no trato

gastrointestinal dos animais em geral, e dos humanos em particular, indica que têm uma “actividade probiótica”, isto é, promovem a boa saúde do hospedeiro. A maioria das espécies são mesófilas, porém também existem espécies psicrótróficas e termófilas. A temperatura óptima de crescimento varia dos 30 aos 45 °C. Quanto ao metabolismo, este género é metabolicamente mais diversificado do que os outros géneros de bactérias lácticas, visto que existem espécies, que conseguem fermentar os açúcares pela via homofermentativa ou heterofermentativa, de acordo com as suas condições ou, até, utilizar as duas vias em simultâneo, ou seja, são heterofermentativas facultativas (Hutkins, 2006).

Muitas espécies de *Lactobacillus* são muito relevantes na fermentação de alimentos. Algumas são adicionadas directamente na forma de culturas *starter*, como é o caso de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei* e *L. acidophilus*, em alimentos lácteos como o iogurte e o queijo. Outros exemplos são *L. plantarum* e *L. brevis*, na produção de *choucroute*, *kimchi* e outros vegetais fermentados (Hutkins, 2006).

As duas espécies de *Lactobacillus* utilizadas neste trabalho foram *L. plantarum* e *L. pentosus*.

Segundo Zanoni *et al.* (1987), estas espécies possuem uma semelhança de DNA entre 50 a 60%. Já segundo Corsetti & Valmorri (2011) estas espécies não podem ser distinguidas através da análise da sequência do gene que codifica para o rRNA 16S, devido à semelhança de sequências que é de 99,7 a 99,9%.

*L. plantarum* é, provavelmente, a bactéria láctica mais usada em fermentação láctica, não só pela elevada taxa de conversão de açúcares, como glucose, frutose e sacarose, em ácido láctico, como também pela utilização de outros compostos como as pectinas presentes nos alimentos (Demir *et al.*, 2006). Além do ácido láctico, são produzidos por esta bactéria muitos produtos secundários. É o caso do diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol que são compostos muito importantes para o sabor de vários produtos lácteos. Outros produtos finais, que resultam do metabolismo desta bactéria, são o ácido acético, o ácido succínico e o dióxido de carbono. O etanol também pode surgir como produto secundário. Os múltiplos produtos secundários resultantes dependem das condições de cultura e das estirpes utilizadas (Corsetti & Valmorri, 2011).

### 1.5.2. *Leuconostoc*

Este género de bactérias lácticas pertence à família *Leuconostocaceae* e é composto por 13 espécies. São mesófilos, variando a temperatura ótima de crescimento entre os 18 e os 25 °C. Quanto à forma, têm aparência de cocos e, por vezes, de bastonete. São heterofermentativos obrigatórios. A maioria das espécies está associada a ambientes específicos. *Leuc. gasicomitatum* está envolvida na deterioração dos alimentos, *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuc. lactis* são utilizados na fermentação de alimentos, nomeadamente em fermentações de leite, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuc. kimchii* e *Leuc. fallax* são usados na fermentação de vegetais (Hutkins, 2006).

Quanto ao metabolismo, por serem heterofermentativas, degradam o açúcar numa mistura de produtos finais: ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Normalmente, diminuem o valor de pH no meio até 4,5-5,0 e a produção de ácido láctico é inferior quando comparada com outros géneros, como *Lactobacillus*. Assim, a acidificação não é a principal função desta bactéria, durante a fermentação. No entanto, os produtos finais de bactérias heterofermentativas resultam numa maior diversificação de *flavor* e aroma em produtos fermentados (Hutkins, 2006).

*Leuc. mesenteroides* é uma espécie que produz um açúcar extracelular, induzido pela presença de sacarose no meio de cultura. Há a formação de dextranos a partir da sacarose, com libertação simultânea de monómeros de frutose. A presença do dissacárido pode modelar a polimerização, resultando na formação de dextranos de menor massa molecular e também a produção de oligossacáridos (Holland & Liu, 2011).

## 1.6. Matérias-primas usadas na fermentação

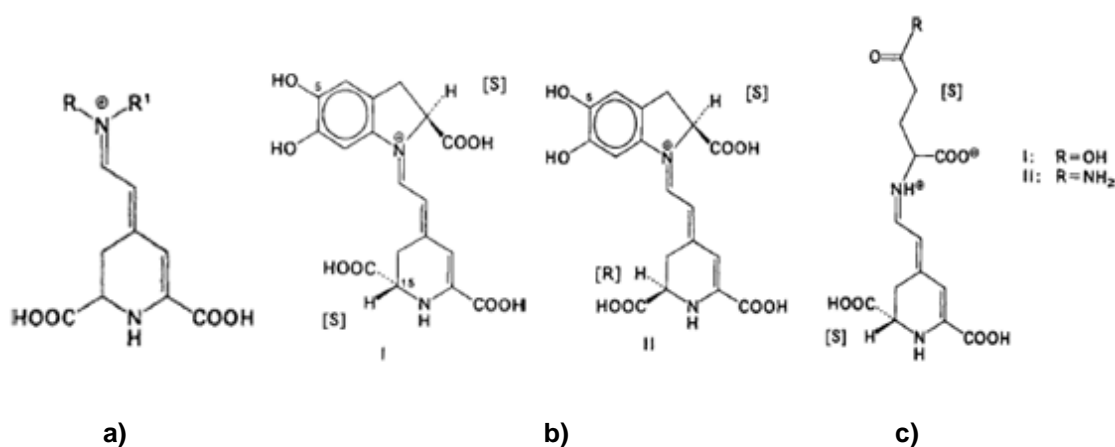
As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram a beterraba, a cenoura e a maçã. Como matérias-primas secundárias utilizaram-se o azeite, os óleos essenciais de orégãos e o de *Mentha cervina*.

### 1.6.1. Beterraba

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) pertence à família *Chenopodiaceae*. É uma raiz tuberosa de cor vermelho-púrpura, popular em algumas regiões do mundo. Normalmente, é consumida crua, cozida ou fermentada, em saladas ou em sumos. Apresenta elevados teores de fibra e de açúcares, mas valor calórico moderado. Além disso, são também boas fontes de vitaminas do complexo B (B1, B2, B3 e B6) bem como de ácido fólico (Quadros 3, 4, 5 e 6) (Latorre *et al.*, 2011).

A cor da beterraba deve-se à presença de betalaínas (Figura 3), que são pigmentos hidrossolúveis. As betalaínas estão divididas em duas classes: betacianinas (cor avermelhada) e betaxantinas (cor amarelada), que caracterizam a coloração típica da raiz da beterraba. Estes pigmentos, além de fornecerem cor à beterraba, são importantes substâncias antioxidantes (Vitti *et al.*, 2004a e 2004b; Latorre *et al.*, 2011; Ravichandran *et al.*, 2011), antimicrobianas e de efeito antiviral e inibem ainda a proliferação de células tumorais (Ravichandran *et al.*, 2011). Além disso, estes pigmentos possuem grande estabilidade numa gama de pH entre 3 e 7, o que os torna adequados para serem utilizados como aditivos em alimentos ácidos e neutros (Stintzing & Carle, 2007).

As betalaínas são usadas como aditivo alimentar para dar coloração a alimentos ou, até mesmo, para enriquecê-los. Estão aprovados pela União Europeia e são rotuladas como E - 162 (Ravichandran *et al.*, 2011).



**Figura 3** - Estrutura geral: **a)** Betalaína, **b)** Betacianinas, (I- Betanidina e II- Isobetanidina) e **c)** Betaxantina, (I e II Vulgaxantinas) (Fonte: Belitz *et al.*, 2009)

As beterrabas possuem um cheiro e sabor a “terra” que muitas vezes leva à rejeição do seu consumo por parte dos consumidores. Esse cheiro deve-se a uma substância, a geosmina [trans-1,10-dimetil-trans-(9)-decalol]. Esta substância, geralmente, está associada, não só à beterraba como, ao “mofo” de peixe, feijões secos, cogumelos em conserva e ao vinho (Lu *et al.*, 2003). É um metabolito volátil produzido por vários microrganismos como *Streptomyces*, algas e fungos (Bentley & Meganathan, 1981; Lu *et al.*, 2003). Inicialmente, considerava-se que este odor provinha da terra onde a beterraba era semeada. Pensava-se que a beterraba absorvia esta substância, visto que muitos microrganismos presentes no solo produzem a geosmina. Porém, Lu *et al.* (2003) e Stintzing & Carle (2007) concluíram que as beterrabas eram capazes da síntese endógena de geosmina.

Algumas das formas que têm sido descritas para a remoção de uma grande parte deste odor da beterraba incluem filtração por membrana e destilação (Stintzing & Carle, 2007).

### 1.6.2. Cenoura

A cenoura (*Dacus carota* L.) pertence à família *Apiaceae* e é um dos vegetais mais utilizados para sumos. Apresenta propriedades anti-sépticas, bem como auxilia no combate a doenças oftalmológicas, reumatismo, anemia, impotência sexual e doenças respiratórias (Fariña *et al.*, 2007). Além disso, a cenoura é uma boa fonte de fibras e é uma fonte natural de  $\beta$ -caroteno, que representa 45-70% dos seus carotenóides totais. O  $\beta$ -caroteno é o precursor da vitamina A e é um antioxidante lipossolúvel que neutraliza radicais livres, combinando-se directamente com eles (Quadros 3, 4, 5 e 6). O uso de  $\beta$ -caroteno foi proposto no combate a algumas doenças como o alcoolismo, asma, depressão, epilepsia, esterilidade masculina e feminina, Parkinson, artrites e esquizofrenia. Foi também demonstrada a redução da probabilidade de ataques cardíacos por ingestão deste nutriente. A carência deste nutriente provoca uma regressão patológica do olho que pode desencadear uma xeroftalmia e, em casos extremos, cegueira (Fariña *et al.*, 2007).

**Quadro 3** - Composição média da beterraba e da cenoura (% da parte edível fresca)

Vegetal	Humidade	Compostos azotados	Glúcidos	Lípidos	Fibra	Cinza
Beterraba	13,8	1,6	8,4	0,1	2,5	1,1
Cenoura	11,8	1,1	4,8	0,2	3,6	0,8

(Adaptado de: Belitz *et al.*, 2009)

**Quadro 4** - Vitaminas e ácidos orgânicos presentes na beterraba e na cenoura (mg/100 g de massa fresca)

	Beterraba	Cenoura
Tiamina	0,03	0,06
Riboflavina	0,05	0,05
Ácido Ascórbico	10	8
Ácido fólico	0,08	0,03
$\alpha$ -tocoferol	0,04	0,4
$\beta$ -caroteno	0,01	7,6
Ácido málico	37	240
Ácido citrico	195	12
Ácido oxálico	181	0-60

(Adaptado de: Belitz *et al.*, 2009)

**Quadro 5** - Minerais mais representativos presentes nas matérias-primas (mg/100 g de massa fresca)

Vegetal	K	Na	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	P	Cl	F
Beterraba	336	86	29	1,4	0,9	0,2	0,4	45	0,2	0,01
Cenoura	321	61	37	13	0,4	0,2	0,3	35	59	0,02

(Adaptado de: Belitz *et al.*, 2009)

### 1.6.3. Maçã Golden

A maçã (*Malus sylvestris*) pertence à família *Rosaceae* e é um dos frutos mais produzidos e consumidos no mundo, existindo diversas variedades de maçã. Este fruto pode ser consumido, fresco, seco, em puré, em geleia, em sumo, entre outras formas. A variedade de maçã escolhida para este trabalho foi a Golden.

A maçã é rica em compostos fenólicos que são responsáveis, em grande parte, pela actividade antioxidante deste fruto. No entanto, o teor de compostos fenólicos em maçãs varia significativamente, consoante as cultivares e as diferentes partes da maçã (Vieira *et al.*, 2011). Os antioxidantes previnem os danos causados pelos radicais livres, o que faz com que o seu consumo previna várias doenças degenerativas (Vieira *et al.*, 2011). De acordo com estes autores, o ácido ascórbico é o constituinte presente na maçã que possui actividade antioxidante mais marcante.

**Quadro 6** – Hidratos de carbono presentes nas matérias-primas (por 100 g de alimento edível)

	Total HC disponíveis (g)	Total HC expresso em monossacáridos (g)	Mono + dissacáridos (g)	Amido (g)	Oligossacáridos (g)	Sacarose (g)
Beterraba	3,5	3,7	3,5	0	0	3,1
Cenoura	4,4	4,5	4,1	0,2	0,1	1,7
Maçã	12,7	12,8	12,7	0	0	2,9

(Adaptado de: INSA, 2007)

### 1.6.4. Orégão

O orégão (*Origanum virens* L.) é uma planta aromática vivaz. As suas folhas são pequenas, ovais de cor verde-claro. O seu nome é de origem grega, *oros* (montanha) e *ganos* (alegria) e significa “esplendor da montanha”, pela beleza que confere aos lugares onde cresce (Kintzos, 2004).

A parte aérea desta planta contém um óleo essencial, cuja composição inclui: terpenos, derivados oxigenados de terpenos, compostos aromáticos contendo uma estrutura benzénica e compostos contendo azoto e enxofre (Heath, 1981). É um óleo essencial rico em compostos fenólicos, nomeadamente timol (Olmedo *et al.*, 2013) e



carvacrol, além de ser rico em flavonóides. O timol e carvacrol são anti-bacterianos e anti-fúngicos conferindo propriedades anti-sépticas aos extractos, o que faz com que sejam utilizados a nível terapêutico e alimentar (Kintzos, 2004). Além disso, contêm antioxidantes que protegem os óleos essenciais durante a armazenagem (Sivropoulou *et al.*, 1996)

À temperatura ambiente, o óleo essencial apresenta-se no estado líquido. É solúvel em substâncias lipídicas, insolúvel em água e emulsionável.

#### **1.6.5. *Mentha cervina***

A *Mentha cervina* L. é uma planta aromática e medicinal tradicionalmente utilizada em Portugal na medicina popular, sendo conhecida como Alecrim-do-rio ([http://jb.utad.pt/especie/mentha\\_cervina](http://jb.utad.pt/especie/mentha_cervina)). Em Portugal pode ser encontrada em rios, pântanos e lugares húmidos (Rodrigues *et al.*, 2012).

Esta planta é utilizada como uma infusão na prevenção de diferentes doenças gástricas e inflamações do tracto respiratório. Segundo Rodrigues *et al.* (2012) a capacidade de prevenção destas doenças deve-se ao óleo essencial desta planta que possui agentes anti-bacterianos, em particular contra bactérias gram-negativas como *E. coli*. De acordo com estes autores, esta capacidade anti-bacteriana deve-se ao efeito sinérgico dos diferentes constituintes do óleo essencial. Dos 33 componentes que constituem este óleo essencial os principais constituintes são os monoterpenos que contêm oxigénio (80-88%), pulegona (52-75 %), isometona (8-24%), limonemo (4-6%) e mentona (1-2%) (Rodrigues *et al.*, 2012).

O óleo essencial de *Mentha cervina* também é utilizado na Indústria Alimentar, bem como na Indústria Farmacêutica, em terapias e em tratamentos.

### **1.7. Funcionalidade dos hortofrutícolas**

Como indicado anteriormente, o consumidor, hoje em dia, têm consciência do impacto de uma alimentação saudável na sua saúde. Esta preocupação tem vindo a reflectir-se na procura crescente por alimentos funcionais. Neste sentido, o desenvolvimento de produtos ricos nestes compostos, entre os quais os compostos fenólicos, é relevante e actual.

Os compostos fenólicos são um grupo de metabolitos secundários produzidos pelas plantas. São caracterizados por uma estrutura aromática, com um ou mais grupos hidróxilo (Rodríguez *et al.*, 2009; Ignat *et al.*, 2011), e as suas estruturas podem variar

de uma simples molécula fenólica a um polímero de elevada massa molecular (Ignat *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos representam um grupo de constituintes dos vegetais muito importantes quer a nível tecnológico, quer a nível das características sensoriais e funcionais dos produtos finais.

Estes compostos têm tido particular interesse devido às suas reconhecidas propriedades antioxidantes e ao provável papel que possuem na prevenção de várias doenças associadas ao stresse oxidativo, tais como cancro, doenças cardiovasculares e degenerativas (Rodríguez *et al.*, 2009). Além disso, retardam o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Cadenas & Packer, 2002; Chun *et al.*, 2005).

A acção destes compostos baseia-se na protecção contra a acção nociva das espécies reactivas de oxigénio (Halliwell & Gutteridge, 1999). Também são importantes no crescimento da planta, e na sua reprodução uma vez que a protegem contra patogénios e predadores (Ignat *et al.*, 2011).

Estes compostos são benéficos, não só para a saúde, como têm interesse a nível industrial pelas suas diversas aplicações. A nível alimentar, contribuem para a pigmentação e características sensoriais de frutos e vegetais, são utilizados como corantes na indústria de tintas, na indústria do papel e também na cosmética (Ignat *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos estão divididos em diferentes grupos, de acordo com a sua funcionalidade, ou pelo número de anéis aromáticos que possuem (Rodríguez *et al.*, 2009). Compreendem desde fenóis simples ( $C_6$ ) até moléculas com elevado grau de polimerização, os polifenóis. Do grupo dos fenóis simples, fazem parte o pirocatecol, a hidriquinona, o resorcinol e os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais (Ribéreau-Gayon, 1968). Os polifenóis compreendem os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos e lignanas (Ignat *et al.*, 2011).

Os polifenóis estão amplamente distribuídos na natureza em plantas, frutos e vegetais. Bebidas como sumos de frutas, chá e vinhos são importantes fontes de polifenóis. O vinho é a mais importante e popular fonte de antioxidantes polifenólicos, que incluem uma grande variedade de flavonóides e não flavonóides (Ignat *et al.*, 2011).

Sob o ponto de vista tecnológico os compostos fenólicos contribuem para a prevenção da deterioração dos alimentos. É o caso da oxidação lipídica que é responsável pelo

cheiro e sabor a ranço, que tem como consequência a diminuição da qualidade e segurança, devido à formação de compostos secundários potencialmente tóxicos (Chevolleau *et al.*, 1992).

Embora os antioxidantes naturais sejam, à partida, mais saudáveis e preferíveis, apresentam algumas restrições de uso, como por exemplo serem restritos a alguns produtos. Outra desvantagem em relação aos antioxidantes sintéticos é o seu custo (Pokorný, 1991).

### **1.8. Objectivos do trabalho**

A Indústria Alimentar procura constantemente a inovação, de forma a responder à procura dos consumidores por produtos que promovam o seu bem-estar e saúde. Neste contexto, o objectivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de três novos produtos fermentados por bactérias lácticas: uma bebida e dois molhos para salada. A bebida teve como base, sumos de beterraba, cenoura e maçã fermentados, com características não alcoólicas e baixo teor de açúcares. Para a bebida foi ainda adicionado óleo essencial de *Mentha cervina*, de modo a conferir um aroma e um sabor mais frescos ao fermentado obtido. Um dos molhos para salada teve por base sumos de beterraba e de cenoura fermentados, o outro molho baseou-se em sumo de beterraba fermentado. Ambos os fermentados possuíam uma acidez natural e um baixo teor de açúcares. Foram ainda adicionados a estes fermentados para molhos, azeite e óleo essencial de oregãos, de modo a acentuar as suas características organolépticas, para o fim a que se destinavam e, eventualmente, reforçar a capacidade antioxidante e o poder de conservação destes produtos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas neste trabalho foram, como já foi mencionado anteriormente, a beterraba, a cenoura, a maçã Golden, os óleos essenciais de orégão e de *Mentha cervina*, e o azeite.

Na fase de ensaios preliminares e na prova sensorial, as beterrabas e as cenouras foram compradas num supermercado da região de Lisboa. As beterrabas utilizadas tiveram duas origens: Portugal e Holanda. As cenouras eram de origem nacional. Em fases posteriores, tanto as beterrabas como as cenouras deixaram de ser compradas e foram colhidas na região de Lisboa, mais propriamente num terreno particular em Arruda dos Vinhos. As beterrabas foram seleccionadas quanto ao tamanho (raízes com 6 a 8 cm de diâmetro). Quanto às cenouras, foram escolhidas aquelas com um comprimento compreendido ente 10-15 cm. As beterrabas e as cenouras foram transportadas e armazenadas sob condições de refrigeração (5 °C).

As maçãs tendo como origem Portugal, foram compradas num supermercado.

Quanto aos óleos essenciais utilizados, o óleo essencial de orégãos foi obtido neste trabalho por destilação a partir de orégãos provenientes da região do Alentejo e o óleo essencial de *Mentha cervina* foi proveniente de uma mistura das plantas colhidas nas zonas ribeirinhas nacionais.

O método de extracção utilizado neste trabalho para obtenção do óleo essencial de óregãos, foi a destilação em aparelho de Clevenger (Figura 4).



**Figura 4** - Obtenção de óleo essencial de orégãos por destilação (Fotografia por Susana Silvério)

As folhas e inflorescências dos orégãos foram colocadas num balão de fundo redondo de 1 L de capacidade e adicionou-se água até cobrir o material vegetal (cerca de 0,5 L). A extracção foi realizada à temperatura de 100 °C, durante 1 hora após início da destilação. O óleo obtido foi recolhido para um frasco de vidro escuro e armazenado no frigorífico.

O azeite utilizado foi um azeite virgem extra, com uma acidez máxima de 0,5% da marca Oliveira da Serra – Clássico. É um azeite português de categoria superior obtido directamente de azeitonas, unicamente por processos mecânicos.

## 2.2. Descontaminação e extracção dos hortícolas

De forma a verificar qual o melhor processo na redução da carga microbiana inicial dos hortícolas (beterraba e cenoura), testou-se a desinfecção por imersão durante 10 minutos em água a 5 °C com 200 mg/L de cloro activo. Testou-se ainda a descontaminação por imersão num banho de água a 100 °C durante 45 segundos.

Para a obtenção dos sumos, o material foi cortado e o sumo extraído em máquinas de fazer sumos (marcas Kenwod e Philips Juice & Co).

## 2.3. Tratamentos térmicos

Os sumos obtidos foram pasteurizados a 80 °C durante 15 minutos (Klewicka *et al.*, 2004) ou esterilizados a 121 °C durante 15 minutos (Yoon *et al.*, 2005).

A validação destes e dos tratamentos anteriores fez-se por avaliação microbiológica.

## 2.4. Estirpes de bactérias lácticas utilizadas

As estirpes de bactérias lácticas descritas no quadro 7, foram usadas neste trabalho de modo a seleccionar as estirpes a utilizar.

**Quadro 7** - Estirpes de bactérias lácticas testadas

Referência	Espécie	Origem
CBISA 3956	<i>Lactobacillus brevis</i>	CECT 216T
CBISA 3957	<i>Lactobacillus collinoides</i>	CECT 922T
CBISA 3958	<i>Lactobacillus paracasei</i>	CECT 4022T
CBISA 3959	<i>Lactobacillus buchneri</i>	CECT 4111
CBISA 3960	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 748T
CBISA 3961	<i>Lactobacillus mali</i>	CECT 4149T
CBISA 3962	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	CECT 4786
CBISA 3963	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	CECT 219T
CBISA 3964	<i>Lactobacillus pentosus</i>	CECT 4023
CBISA 4226	<i>Lactobacillus plantarum</i>	CECT 220
CBISA 4279	<i>Oenococcus oeni</i>	(Barata <i>et al.</i> , 2012)
CBISA 4280	<i>Lactobacillus brevis</i>	(Barata <i>et al.</i> , 2012)
CBISA 4281	<i>Lactobacillus brevis</i>	(Barata <i>et al.</i> , 2012)

CBISA – Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia. CECT – Colección Española de Cultivos Tipo.

As bactérias utilizadas neste trabalho constam ainda da lista emitida anualmente pela EFSA de microrganismos que podem ser incluídos na alimentação de modo seguro (EFSA, 2012).

### **2.5. Condições de cultura e de manutenção das estirpes**

As estirpes de bactérias lácticas utilizadas, encontravam-se conservadas a -80 °C em meio de cultura MRS *Broth* com 15% (v/v) de glicerol.

Foi constituída a colecção de trabalho através da inoculação por picada em tubos de MRS semi-sólido (0,7% de agar) com 1 g/L de carbonato de cálcio. Estes tubos foram a incubar a 30 °C por 24 horas após o que se conservaram em frigorífico, a 4 °C.

De modo a confirmar a pureza das culturas, procedeu-se à inoculação em placas de MRS e incubação a 30 °C, durante 48 horas.

Para a preparação dos inóculos, a partir de colónias isoladas em placas de MRS, inocularam-se tubos com 10 mL de MRS *Broth*, levando a incubar a 30 °C, durante 24 horas.

A composição dos meios de cultura e soluções utilizadas neste trabalho encontram-se descritas no Anexo I.

### **2.6. Determinações microbiológicas e físico-químicas**

#### **2.6.1. Contagem de microrganismos totais a 30 °C**

Para esta contagem, utilizou-se a norma ISO 4833:2003. Preparou-se a suspensão mãe e uma série de diluições. Inoculou-se 1 mL da solução mãe de cada sumo e respectivas diluições, utilizando o método de incorporação em meio PCA. As placas foram a incubar a 30 °C  $\pm$  1 °C durante 72 horas  $\pm$  3 horas. Após este tempo, procedeu-se à contagem de todas as colónias desenvolvidas e calculou-se o número de unidades formadoras de colónias por mililitro de sumo (UFC/mL).

#### **2.6.2. Contagem de bolores e leveduras**

Para esta contagem, preparou-se a suspensão mãe e série de diluições, e inocularam-se 0,1 mL das respectivas soluções por espalhamento, em placas de meio GYP. As placas foram a incubar a 25 °C durante 120 horas. Após este tempo, procedeu-se à contagem de todas as colónias, diferenciando bolores e leveduras.

### **2.6.3. Contagem de *Bacillus cereus***

Para proceder à contagem de *Bacillus cereus*, preparou-se a suspensão mãe e série de diluições, e inoculou-se 0,1 mL das respectivas soluções pelo método de espalhamento, em placas de meio BCA. As placas foram colocadas a incubar a 30 °C durante 24 horas  $\pm$  24 horas. Após este tempo, procedeu-se à contagem de colónias características (colónias rosa com precipitado à volta das colónias) e calculou-se o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL).

### **2.6.4. Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito redutores**

Para a pesquisa de esporos, preparou-se a suspensão mãe e série de diluições, e foram inoculados 1 mL das respectivas soluções e posteriormente incorporou-se o meio TSN. Após solidificação das placas, adicionou-se mais uma camada de meio TSN. Em seguida, as placas foram colocadas em estufa a incubar a 37 °C  $\pm$  1 °C durante 24-48 horas. Após este tempo, procedeu-se à contagem de colónias características (colónias negras) e calculou-se o número de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL).

### **2.6.5. Bactérias lácticas em co-cultura**

Uma vez que um dos produtos desenvolvidos possui dois géneros de bactérias lácticas em co-cultura, houve a necessidade de distinguir o crescimento destas duas bactérias. Nesse sentido procurou-se obter um meio no qual o crescimento das bactérias fosse possível de distinguir. Foram testados três meios diferentes: Mayeux, Acetato e M17, além do MRS.

### **2.6.6. pH**

A medição dos valores de pH, nos sumos, foi efectuada à temperatura ambiente ( $\approx$  20 °C), recorrendo a um eléctrodo ligado a um potenciómetro (Shott Instruments, Lab 850) previamente calibrado para pH=4 e pH=7. Anteriormente à medição do pH, a amostra foi desgaseificada, por agitação magnética.

### **2.6.7. Teor de açúcares**

O teor de açúcares, totais e redutores, foi efectuado em amostras não fermentadas (T0) e em amostras com diferentes tempos de fermentação (T6, T12, T18, T24).

As amostras não fermentadas e as fermentadas, foram igualmente centrifugadas (Eppendorf, Centrifuge 5415 D) durante 10 minutos a 9 300 g.

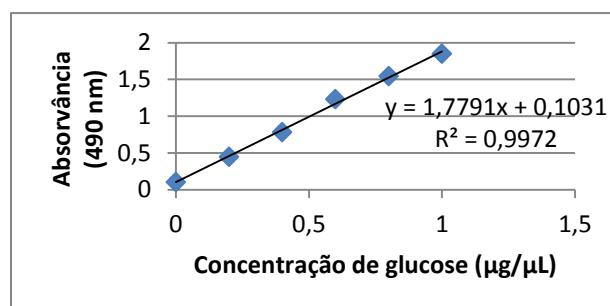
Todas as determinações foram efectuadas em triplicado.

### 2.6.7.1. Método fenol-sulfúrico

O método fenol-sulfúrico é um método colorimétrico, que se baseia na combinação entre um açúcar simples e o fenol com o ácido sulfúrico que dá origem a uma cor amarelo-laranja. A intensidade da coloração laranja é proporcional à quantidade total de açúcares presentes.

É o método mais simples e fiável para a medição de açúcares neutros em oligossacáridos, glicoproteínas e glicolípidos. Além disso, é amplamente utilizado devido à sua sensibilidade (Masuko *et al.*, 2005).

Preparou-se uma solução padrão de glucose com uma concentração de 5 µg/µL. A partir desta solução preparam-se outras diferentes concentrações de glucose entre 0 a 1 µg/µl (Figura 5).



**Figura 5** - Curva de calibração do método fenol-sulfúrico

Utilizou-se uma microplaca, onde em cada poço adicionaram-se 5 µL de amostra e 20 µL de água ultra pura. Em seguida, adicionaram-se 25 µl de fenol a 40% (v/v) a cada poço, misturou-se e deixou-se repousar por 5 minutos. Em seguida, adicionaram-se 200 µl de ácido sulfúrico a cada poço e misturou-se novamente. Foi colocada a microplaca no *microplate reader* (Bio-Rad, Modelo 680) de modo a ler a absorvância a 490 nm (*software* Microplate Manager) (Hounsell, 1998).

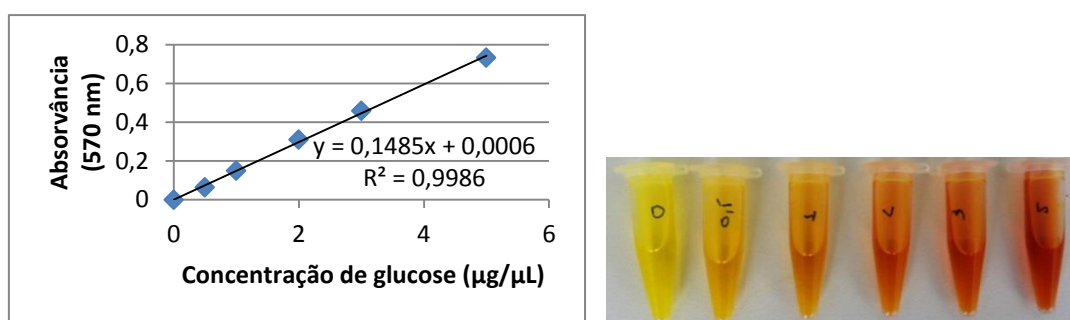
### 2.6.7.2. Método DNS

Tal como o método fenol-sulfúrico, este método é também um método colorimétrico, no qual o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) mostra um comportamento diferencial para monossacáridos e dissacáridos (Saqib & Whitney, 2011). Baseia-se na redução, em solução alcalina, do ácido 3,5-dinitrossalicílico a ácido 3-amino-5-nitrossalicílico.

Para este método, preparou-se de igual forma uma solução de glucose, com uma concentração de 5 µg/µL. A partir da solução de glucose, prepararam-se as soluções



para a curva de calibração, com concentrações de glucose entre 0 a 5 µg/ µl (Figura 6). Em relação às amostras, em cada microtubo, foram adicionados 100 µL de amostra. Posteriormente, foram adicionados a cada microtubo, 1000 µL da solução DNS previamente preparada. Cada microtubo foi agitado em vórtex e, em seguida, foram colocados em suporte num banho de água a 100 °C durante 10 minutos. Após esse tempo, os microtubos foram arrefecidos em gelo, até à temperatura ambiente, e foi determinada a absorvância em espectrofotómetro (Boeco Germany, S-20) a 570 nm (Chaplin & Kennedy, 1994).



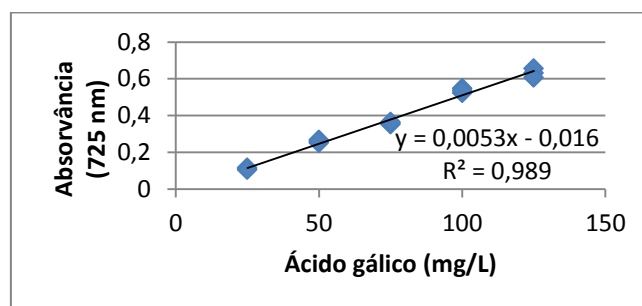
**Figura 6** - Curva de calibração do método DNS (Fotografia por Susana Silvério)

#### 2.6.8. Determinação de compostos fenólicos

O método utilizado para a determinação de compostos fenólicos foi baseado em Swain & Hillis (1959). Este método, baseia-se numa reacção colorimétrica promovida pelo reagente Folin.

Foi utilizada uma solução inicial de ácido gálico (1000 mg/L) para a construção da curva de calibração. A partir desta solução, foram construídos pontos de concentração de 25 a 125 mg/L (Figura 7).

Inicialmente procedeu-se à etapa de extracção dos compostos fenólicos das amostras. Foi efectuada na proporção 1:4 (v:v) de amostra e metanol (100%), em triplicado, seguida de homogeneização. Deixou-se repousar em câmara refrigerada (4 °C), entre 12-24 horas. Procedeu-se à centrifugação (Hermle Labortechnik Z 383K), 8000 rpm durante 20 minutos a 4 °C e, em seguida, filtrou-se, com filtros de 125 mm de diâmetro n.º 1 (Whatman). Recolheu-se o sobrenadante.



**Figura 7** - Curva de calibração para a determinação de compostos fenólicos

Na etapa de doseamento, em tubos de ensaio foram colocados 2400  $\mu\text{L}$  de água destilada, 150  $\mu\text{L}$  de amostra (sobrenadante obtido anteriormente) e 150  $\mu\text{L}$  do reagente Folin (0,25 M). Cada tubo foi agitado em vórtex e ao fim de três minutos adicionou-se a cada tubo 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M). Após nova agitação, os tubos foram deixados a repousar no escuro, por duas horas, à temperatura ambiente. Após esse tempo, efectuaram-se as leituras em espectrofotómetro (Unicam UV/Vis) a 725 nm. Os resultados foram obtidos através do *software* Vision V3.31.

#### 2.6.9. Determinação de actividade antioxidante

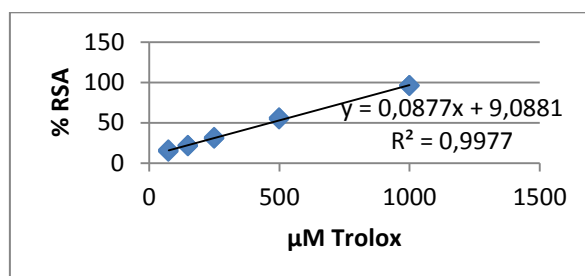
A determinação da actividade antioxidante foi efectuada por dois métodos: o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e o método FRAP (Método de Redução do Ferro). Para ambos os métodos, foi utilizado o Trolox, sendo equivalente à vitamina E, como substância padrão. Foi estabelecida uma curva padrão com cinco pontos de concentração entre 75 a 600  $\mu\text{M}$  (Figuras 8 e 9). A etapa de extracção para estes métodos, foi idêntica à efectuada na determinação de compostos fenólicos.

##### 2.6.9.1. Método DPPH

O método DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995), é um método químico que utiliza o DPPH que é um radical de azoto orgânico, estável, de cor violeta (Sucupira *et al.*, 2012). Em contacto com a amostra que se pretende analisar, a sua intensidade de absorção diminui, de acordo com o poder antioxidante da amostra, perdendo a sua cor original violeta, passando para cor amarelo, o que se traduz num decréscimo de absorvância a 517 nm.

Neste método, foram preparadas duas soluções: uma solução-mãe de DPPH e uma solução diária de DPPH. A solução-mãe de DPPH foi preparada, pelo menos duas horas antes da realização do método. A solução diária foi preparada a partir desta solução, para ser usada imediatamente. Foi preparado a solução diária de DPPH, para calibração do valor de absorvância, visto que esta solução tinha como requisito não ultrapassar a absorvância de 1,1. A reacção ocorreu na própria cuvette.

Assim, foram utilizadas para cada amostra, cuvettes em triplicado. A cada cuvette foram adicionadas 2850  $\mu\text{L}$  de solução diária e 150  $\mu\text{L}$  de amostra. Deixou-se incubar durante 40 minutos no escuro à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, procedeu-se à leitura das absorvâncias em espectrofotómetro (Unicam UV/Vis) com um comprimento de onda de 517 nm.



**Figura 8** - Curva de calibração do método DPPH

Através dos valores de absorvância obtidos, determinou-se o RSA (Radical Scavenging Activity) em %. Para tal seguiu-se a seguinte formula:

$$\text{RSA (\%)} = (\text{Abs. diária} - \text{Abs. da amostra} / \text{Abs. diária}) \times 100$$

Para o cálculo de  $\mu\text{M}$  de Trolox, utilizou-se a recta de calibração obtida:  $y = m \times x + b$ , no qual o y será o valor de RSA e x será o valor de Trolox ( $\mu\text{M}$ ), isto é,

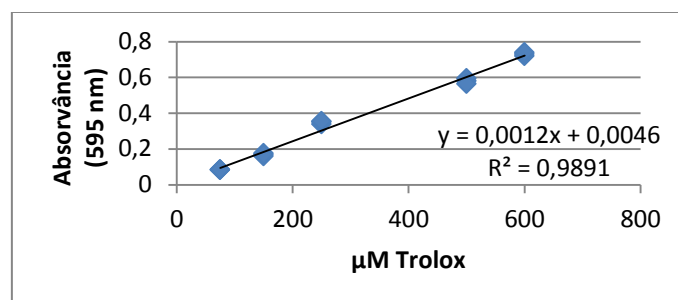
$$\mu\text{M Trolox} = (\text{RSA (\%)} - b) / m$$

#### 2.6.9.2. Método FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) baseia-se na redução do complexo férrico-tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPZ) ao complexo ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPZ), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reacção possui uma coloração azul intensa (Sucupira *et al.*, 2012).

Para este método, foi necessário preparar previamente as seguintes soluções: solução de HCL 40 mM, solução tampão acetato 0,3 M, solução de cloreto de ferro, solução TPTZ 10 mM e por último solução do reagente FRAP. Assim, teve-se em conta a quantidade necessária de reagente FRAP para preparar as soluções indicadas. A cada tubo de ensaio, adicionaram-se 90  $\mu\text{L}$  de amostra, juntaram-se 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL da solução FRAP. Em seguida, os tubos de ensaio foram

homogeneizados recorrendo ao vórtex, e foram colocados em banho de água durante 30 minutos a 37 °C. Após esse período, efectuaram-se as leituras das absorvâncias em espectrofotómetro (Unicam UV/Vis) a 595 nm (Rufino *et al.*, 2006).



**Figura 9** - Curva de calibração do método FRAP

## 2.7. Desenvolvimento de produtos fermentados

### 2.7.1. Ensaio preliminares

Uma vez estabelecidas as condições de descontaminação da matéria-prima e tratamento térmico dos sumos, procedeu-se à selecção das estirpes de bactérias lácticas capazes de acidificar rapidamente os sumos e com as melhores características sensoriais, após fermentação.

As 13 estirpes de bactérias lácticas (Quadro 7) foram colocadas a fermentar em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 50 mL com 25 mL de sumo (beterraba e cenoura). As fermentações decorreram em estufa com agitador orbital, a uma temperatura de 25 °C e agitação de 90 rpm.

A selecção baseou-se essencialmente no aroma dos sumos fermentados. Foram seleccionadas seis estirpes (três responsáveis por aroma doce e três por aroma ácido) para prosseguir o trabalho.

Inicialmente, realizaram-se ensaios preliminares, com o objectivo de testar a possibilidade de obtenção de bebida e/ou molho para salada, com as seis estirpes seleccionadas. Foram testados alguns sumos (beterraba, cenoura, maçã, limão, cebola de duas variedades (castanha-amarelada e vermelha)), algumas misturas dessas matérias-primas, em diferentes proporções, com estirpes em mono-cultura e estirpes em co-cultura e diferentes tempos de fermentação, de forma a cumprir o objectivo do trabalho.

As condições de fermentação, para estes ensaios preliminares, foram iguais às condições utilizadas para a seleção de estirpes. Foi sempre utilizado um frasco Erlenmeyer com sumo não inoculado, como controlo.

As melhores formulações, foram pré-seleccionadas através de avaliação sensorial. Recorreu-se a um painel de provadores não treinado, composto por sete pessoas. Foi pedida a caracterização de cada amostra, através da exposição dos vários atributos positivos e negativos (Anexo II).

Com a realização destes pré-ensaios, foram obtidos três produtos (Figura 10) para dar continuidade ao trabalho. Foram estipulados: o tempo de fermentação; o fim a dar aos produtos e as estirpes a utilizar em cada produto.

### **2.7.2. Produção dos sumos fermentados**

As fermentações decorreram em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de capacidade e com 150 mL de sumo a fermentar. O tempo de fermentação estipulado para os ensaios foi de 24 horas e as condições estipuladas foram temperatura de 25 °C e agitação de 90 rpm.

#### **2.7.2.1. Bebida**

Para a obtenção da bebida, foram utilizados os sumos de beterraba, de cenoura e de maçã na proporção de 10, 40 e 50% respectivamente. Inoculou-se *L. plantarum*, com uma concentração inicial de cerca de  $8 \times 10^7$  UFC/mL.

#### **2.7.2.2. Molho de beterraba e cenoura para salada**

Para a produção do molho para salada, constituído pela mistura de sumo de beterraba e de cenoura, foram utilizados os sumos nas proporções de 20 e 80%, respectivamente. Na preparação deste produto foram utilizadas duas estirpes de bactérias lácticas em co-cultura, nas respectivas concentrações iniciais *L. plantarum* ( $1,1 \times 10^8$  UFC/mL) e *Leuc. mesenteroides* ( $1,2 \times 10^8$  UFC/mL).

#### **2.7.2.3. Molho de beterraba para salada**

Para a obtenção do segundo molho para salada, foi utilizado 100% de sumo de beterraba. Foram inoculados aproximadamente  $6 \times 10^7$  UFC/mL da estirpe *L. pentosus*.

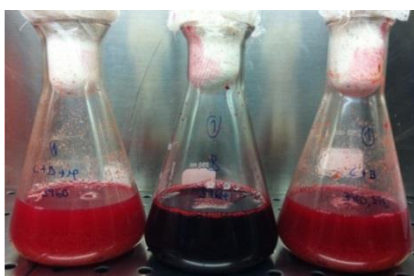
### **2.7.3. Monitorização dos ensaios**

De forma a monitorizar o desenvolvimento da fermentação, foram realizados ensaios para os três produtos. Assim, desde o início da fermentação ( $t_0$ ) de duas em duas horas até as 24 horas ( $t_{24}$ ), foi medido o valor de pH e foi retirado 1 mL de amostra que foi sucessivamente diluída em solução de Ringer para determinação do número

de UFC/mL, em placas de MRS pelo método de espalhamento à superfície. Posteriormente, as placas foram colocadas em posição invertida em estufa a 30 °C. Após 48 horas de incubação, foram contadas as UFC presentes nas placas.

A cada seis horas foi também, retirada amostra (cerca de 5 mL) para congelação, para posterior realização de métodos de determinação de açúcares totais e açúcares redutores.

Após as 24 horas de fermentação, todos os produtos fermentados foram colocados em tubos de Falcon esterilizados de 50 mL e imediatamente congelados de modo a parar a fermentação.



**Figura 10** - Visualização da aparência das três amostras seleccionadas para continuação do trabalho (Fotografia por Susana Silvério)

## 2.8. Formulação final dos produtos fermentados

Após obtenção dos três produtos, foi necessário realizar alguns ajustes. Para a bebida, foi necessário otimizar a quantidade de óleo essencial de *Mentha cervina* a adicionar. No caso dos molhos para salada, foi necessário otimizar também, a quantidade de óleo essencial de orégãos a adicionar, bem como a quantidade e o tipo de azeite a incorporar, o tipo e a quantidade de emulsionante a colocar, se necessário.

Para a realização desta optimização, foram utilizados balões volumétricos com capacidade para 10 mL.

No caso dos molhos para salada, foram testados diferentes azeites e várias proporções. Uma vez que os molhos para salada, são constituídos por duas fases imiscíveis, foram testados três emulsionantes de grau alimentar: Tween 80 (Aldrich), Methocel MX 0209 (Dowolf cellulose) e Sucrose Ester Sisterna SP50 (E473) (Sisterna). Para cada emulsionante, experimentaram-se diferentes quantidades. Após adição dos emulsionantes e agitação, deixaram-se os balões em repouso durante algum tempo de forma a verificar por comparação com o controlo, qual o melhor emulsionante.

Quanto à adição de óleos essenciais, o óleo essencial de orégãos para os molhos e o óleo essencial de *Mentha cervina* para a bebida, foram igualmente testadas diferentes concentrações.

### **2.9. Avaliação do tempo de vida útil dos sumos e produtos fermentados**

Com vista à avaliação microbiológica e físico-química dos três produtos, quando sujeitos a armazenagem, realizou-se um estudo que compreendeu duas fases.

Na primeira fase, avaliou-se a estabilidade somente dos sumos fermentados, isto é, sem adição de azeite e de óleos essenciais. Assim, após a fermentação, uma porção de cada produto foi directamente armazenada no frigorífico, enquanto outra foi esterilizada (121 °C durante 5 ou 15 minutos), de modo a eliminar as bactérias lácticas. Posteriormente, armazenou-se em frigorífico.

Na segunda fase, os molhos para salada foram avaliados como produtos finais, ou seja, incorporados com a proporção previamente estabelecida de azeite e de óleo essencial para cada produto. Tal como na primeira fase, os produtos foram armazenados em frascos brancos opacos esterilizados, cada com capacidade para 25 mL de produto: uma porção de cada produto foi directamente armazenada no frigorífico, enquanto outra foi esterilizada. A porção de produtos esterilizados, foi colocada nos frascos protegidos por folha de alumínio e armazenada à temperatura ambiente controlada (25 °C).

Em ambas as fases, foram recolhidas amostras em dias alternados para análise microbiológica. A nível físico-químico foi medido o valor de pH e foi ainda realizada avaliação ao aroma e ao sabor.

### **2.10. Análise sensorial**

A análise sensorial foi realizada no DCEB (Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas) no Edifício Ferreira Lapa, no Instituto Superior de Agronomia, numa sala de provas com seis cabines individuais. Nesta prova, participaram 32 provadores (painel não treinado) de ambos os sexos, com idades compreendidas entre os 19 e os 64 anos, aos quais foi pedido para classificarem os produtos, no que respeita a cor, aroma, gosto, entre outros (Anexo III). Esta análise foi efectuada aos três produtos fermentados sem esterilização posterior. Os três produtos foram descongelados e mantidos à temperatura de refrigeração, em tubos de Falcon de 15 mL esterilizados, até à hora da prova. Previamente a cada prova, cada tubo foi agitado e foram distribuídos 10 mL de cada produto em copo descartável, acompanhado com tiras de maçã e algumas folhas de alface, caso o provador desejasse experimentar os molhos

com alface. Em primeiro lugar, foi provada a bebida, e em seguida os dois molhos para salada, sem ordem estipulada.

#### **2.11. Análise Estatística**

Os resultados relativos à análise sensorial dos três produtos (fermentados para bebida e para molhos para salada) foram tratados através da Análise em Componentes Principais (ACP) utilizando os programas *Microsoft Office Excel 2010* e *Statistica* versão 6.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Características microbiológicas dos hortícolas

Neste trabalho foi realizada uma avaliação microbiológica aos hortícolas utilizados (beterraba e cenoura), de modo a conhecer a carga microbiana destes.

A beterraba, na contagem de microrganismos totais a 30 °C apresentou cerca de 7 Log UFC/mL, na contagem de bolores e leveduras e de *Bacillus cereus* o resultado obtido foi inferior a 100 UFC/mL. Quanto à contagem de esporos clostrídios sulfito redutores, o resultado foi inferior a 10 UFC/mL.

A cenoura, na contagem de microrganismos totais a 30 °C apresentou cerca de 5 Log UFC/mL e cerca de 4,9 Log UFC/mL na contagem de bolores e leveduras. As contagens de *Bacillus cereus* e de esporos de clostrídios sulfito redutores não foram determinadas para este hortícola.

A descontaminação efectuada a estes hortícolas, tanto por cloro activo como por água quente (ver ponto 2.2) revelou-se ineficaz. De facto, verificou-se uma diminuição da carga microbiana, não se tendo no entanto eliminado por completo a microbiota presente.

#### 3.2. Tratamentos térmicos aplicados às matérias-primas

##### 3.2.1. Características microbiológicas dos sumos

Os tratamentos térmicos aplicados aos sumos das matérias-primas, tiveram como objectivo eliminar a sua microbiota natural. Primeiramente, foi testada a pasteurização (15 minutos/80 °C), que se revelou ineficaz, uma vez que após 24 horas de incubação, foi obtido crescimento em placa. Experimentou-se então, uma esterilização dos sumos obtidos (15 minutos/121 °C) e após 24 horas de incubação dos sumos, assim esterilizados, não foi obtido nenhum crescimento em placas. Concluiu-se assim, que os sumos teriam de ser esterilizados antes da fermentação. Este resultado está de acordo com Fariña *et al.* (2007), no caso do sumo de cenoura e com Yoon *et al.* (2005), relativamente ao sumo de beterraba, que procederam à esterilização prévia dos respectivos sumos.

No entanto, a esterilização assegura a qualidade e a segurança microbiológica dos sumos, mas destrói vitaminas, enzimas e provoca reacções de Maillard (Gardner *et al.*, 2001).

### 3.2.2. Valor de pH dos sumos

O valor de pH dos alimentos está directamente relacionado com a presença de microrganismos. É um factor intrínseco que distingue os frutos dos hortícolas. A fruta geralmente tem pH ácido ( $< 4,5$ ) e os hortícolas em geral não possuem um valor de pH tão ácido ( $> 4,5$ ). As bactérias, geralmente, não conseguem crescer na fruta, porque preferem valores de pH próximos da neutralidade. Geralmente podem crescer, nestas matrizes leveduras ou bolores. Os hortícolas, já permitem o desenvolvimento de algumas bactérias patogénicas e fungos.

Os valores de pH relativos aos três sumos obtidos, sem tratamento térmico e com tratamento térmico, encontram-se no quadro seguinte.

**Quadro 8-** Resultados relativos aos valores de pH para os sumos de beterraba, de cenoura e de maçã com e sem tratamentos térmicos

pH	Beterraba	Cenoura	Maçã
Sem tratamento térmico	6,37	6,03	nd
Pasteurização	6,20	6,02	nd
Esterilização	5,95	5,84	3,76

nd- não determinado

Os valores de pH obtidos são semelhantes aos valores registados na bibliografia. De acordo com Alegria *et al.* (2009) o valor de pH obtido para o sumo de cenoura sem tratamento, isto é o controlo, foi de 6,2. Segundo Fariña *et al.* (2007) o valor de pH para o sumo de cenoura situa-se entre 6,5 e 6,7. Por fim Demir *et al.* (2006) faz referência ao valor inicial de pH do sumo de cenoura sendo 5,67. No presente trabalho, o sumo de beterraba sem tratamento térmico, apresentou um valor de pH de 6,37, o que correspondeu aproximadamente aos resultados obtidos em Yoon *et al.* (2005) que foi de 6,3.

Constatou-se um decréscimo do valor de pH após o tratamento térmico, embora ligeiro, e isso mostrou-se de acordo com os resultados apresentados no artigo de Gardner *et al.* (2001), fazendo referência à pequena variação dos valores de pH de vegetais, antes e depois do tratamento térmico.

## 3.3. Desenvolvimento de produtos fermentados

### 3.3.1. Ensaio preliminares

Das 13 estirpes inicialmente seleccionadas para os ensaios, seis foram consideradas adequadas para os ensaios de fermentação, devido às características sensoriais que conferiam aos fermentados.

Como resultado de sucessivas avaliações sensoriais preliminares, surgiu uma amostra potencial para bebida (carácter doce) e duas para molho para salada (carácter ácido).

Constatou-se que a mistura de sumo de beterraba, sumo de cenoura e sumo de maçã fermentados pela estirpe 3960 (*L. plantarum*), seria ideal para uma bebida, pela doçura apresentada.

O quadro 9, contém os resultados relativos aos ensaios preliminares, realizados para a mistura dos três sumos na proporção estipulada, com estas estirpes de bactérias lácticas em mono-cultura.

**Quadro 9** - Resultados da avaliação sensorial e do valor de pH na mistura de sumo de beterraba, cenoura e maçã (10%, 40% e 50% respectivamente) fermentados.

Estirpes	pH Inicial	pH (24 h)	Avaliação sensorial
<b>3960</b>	5,20	3,86	Doce muito agradável
<b>3961</b>	5,20	3,86	Doce
<b>3962</b>	5,20	3,84	Agridoce
<b>3963</b>	5,20	3,88	Menos doce
<b>3964</b>	5,20	3,95	Ácido
<b>4279</b>	5,20	3,86	Ácido

A mistura de sumos de beterraba e cenoura, foi também eleita para ensaios de fermentação. Realizaram-se testes para esta mistura, com estirpes em mono e em co-cultura. Os resultados mais interessantes revelaram-se com a utilização de estirpes em co-cultura (quadro 10).

**Quadro 10** - Resultados da avaliação sensorial e do valor de pH da mistura de sumo de beterraba e de cenoura (1:5) fermentadas por co-culturas

Co-cultura	pH Inicial	pH (24 h)	Avaliação sensorial
<b>3963+3956</b>	6,07	3,68	Doce
<b>3963+3960</b>	6,07	3,71	Ácido (Agradável)
<b>3963+3961</b>	6,07	3,64	Doce c/pico ácido
<b>3963+3962</b>	6,07	3,81	Doce
<b>3963+3964</b>	6,07	3,74	Ácido
<b>3963+4226</b>	6,07	3,68	Ácido
<b>3963+4280</b>	6,07	3,73	Doce
<b>3963+4281</b>	6,07	3,70	Doce

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a combinação de estirpes que apresentou melhores resultados, ao nível de valor de pH e de características organolépticas, foi a combinação (3963+3960), isto é, *Leuc. mesenteroides* e *L. plantarum*.

Para distinguir o crescimento destas duas bactérias lácticas, foram testados alguns meios de cultura: Mayeux, Acetato, M17 e MRS. Após o tempo de incubação, verificou-se que ambas as bactérias formavam colónias com características culturais indiferenciáveis nas placas, ou seja, não foi possível observar-se diferenças entre os dois géneros.

O sumo de beterraba, sem qualquer adição, foi também escolhido para ensaios de fermentação.

**Quadro 11** - Resultados da avaliação sensorial e do valor de pH do sumo de beterraba fermentado.

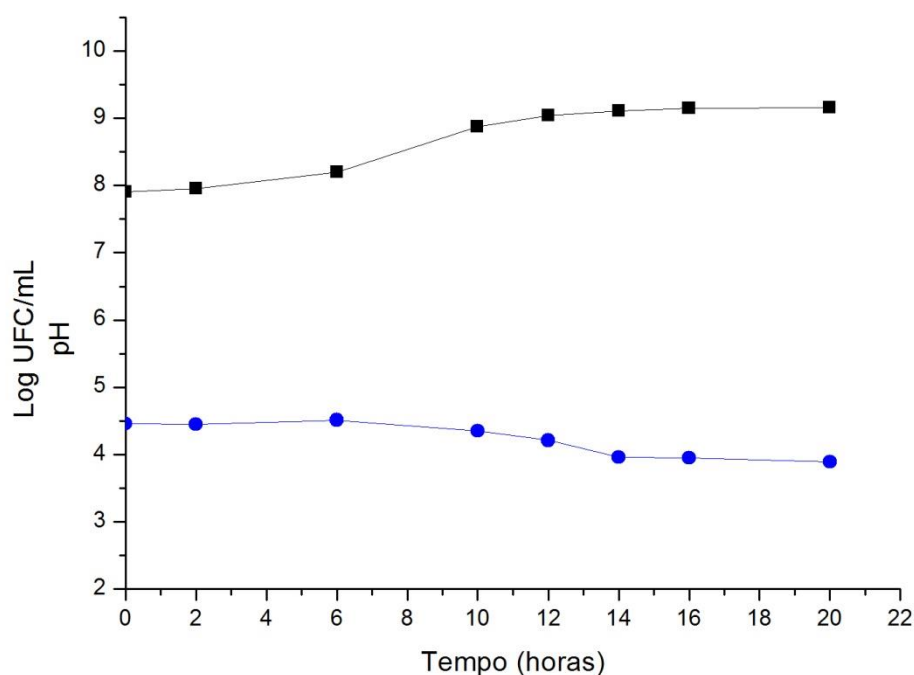
Estirpes	pH inicial	pH (24 h)	Avaliação sensorial
<b>3960</b>	5,95	4,08	Doce, cheira a beterraba e a fumo
<b>3961</b>	5,95	4,00	Doce, cheira a beterraba e a fumo
<b>3962</b>	5,95	4,05	Doce, cheira a beterraba e a fumo
<b>3963</b>	5,95	4,03	Doce c/pico ácido, cheira a beterraba
<b>3964</b>	5,95	4,08	Doce c/pico ácido, cheira a beterraba (melhor aroma)
<b>4279</b>	5,95	4,02	Doce c/pico ácido, cheira a beterraba

Em geral, nos ensaios descritos no quadro 11, não houve nenhuma estirpe que eliminasse o aroma a beterraba. No entanto, teve-se em conta, a estirpe que forneceu melhores resultados, que foi a 3964 (*L. pentosus*).

Foram ainda testadas outras adições ao sumo de beterraba, com o objectivo de eliminar o seu sabor característico, nomeadamente sumo de limão e sumos de diferentes tipos de cebola, tendo sido excluídas devido às características sensoriais desfavoráveis que apresentaram nas diferentes proporções testadas.

### 3.3.2. Ensaios de fermentação para a obtenção de bebidas fermentadas

Na figura 11, pode observar-se o decorrer da fermentação por *L. plantarum* da mistura de sumo de beterraba (10%), cenoura (40%) e maçã (50%), destinada a bebida.



**Figura 11** - Monitorização dos valores de pH e Log UFC/mL em sumo fermentado por *Lactobacillus plantarum*.

*L. plantarum* (3960) (Log UFC/mL) (—■—) e pH (—●—).

No início da fermentação, o valor de bactéria láctica utilizada foi cerca de 8 Log UFC/mL e às 12 horas passou para cerca de 9 Log UFC/mL. A partir daí observou-se uma estabilização, até às 20 horas.

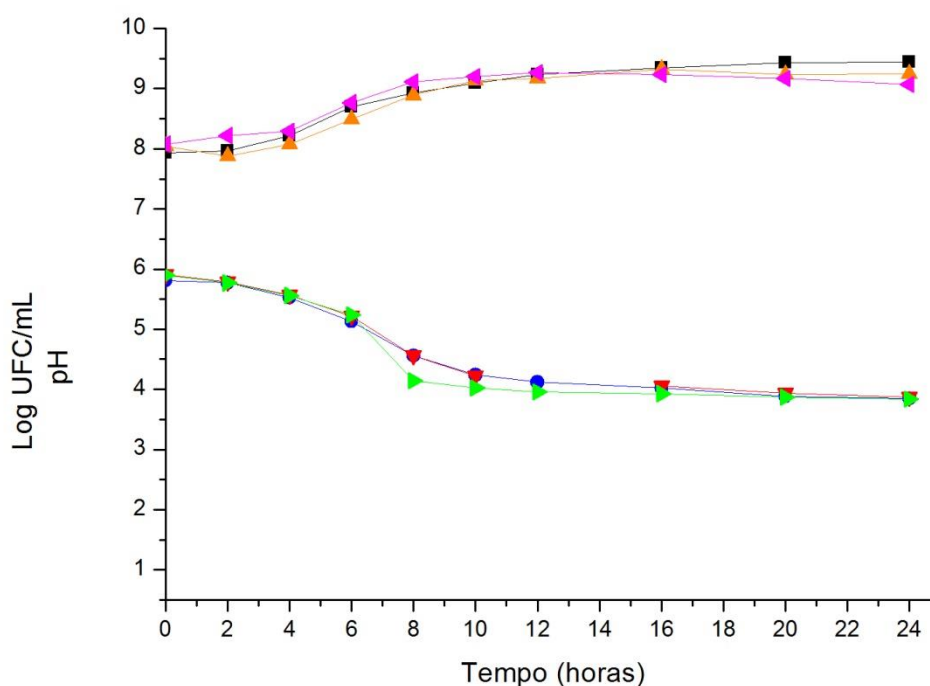
É visível o decréscimo do valor de pH, de 4,46 para 4,21 ao fim de 12 horas de fermentação, tendo atingindo o valor de 3,89 às 20 horas.

### 3.3.3. Ensaio para obtenção de molhos fermentados para salada

#### 3.3.3.1. Molho de beterraba e cenoura

Foi realizado um ensaio com cada estirpe em mono-cultura e foi também realizado um ensaio com ambas as estirpes em co-cultura. Assim, separadamente, foi possível esclarecer melhor o crescimento individualizado destas bactérias e a sua interacção.

Para os ensaios de fermentação das estirpes em mono-cultura, inocularam-se aproximadamente 8 Log UFC de *L. plantarum*/mL e cerca de 8 Log UFC de *Leuc. mesenteroides*/mL. Para a fermentação com a utilização das estirpes em co-cultura, inocularam-se cerca de 8 Log UFC de um total de bactérias lácticas/mL.



**Figura 12** - Monitorização dos valores de pH e Log UFC/mL, em sumo de beterraba e cenoura fermentado por *Lactobacillus plantarum* e/ou *Leuconostoc mesenteroides*, para obtenção de molho para salada.

Microrganismos totais (Log UFC/mL) (■); pH referente aos microrganismos totais (◆); *L. plantarum* (3960) (Log UFC/mL) (▲); pH referente à *L. plantarum* (▼); *Leuc. mesenteroides* (3963) (Log UFC/mL) (◆) e pH referente à *Leuc. mesenteroides* (▼).

Observando a figura 12, verificou-se que ambas as bactérias lácticas utilizadas individualmente ou em co-cultura, relativamente aos parâmetros medidos, apresentam comportamentos semelhantes.

Às 12 horas de fermentação o valor de microrganismos totais era de aproximadamente 9 Log UFC/mL. A partir daí observou-se um ligeiro decréscimo até às 24 horas.

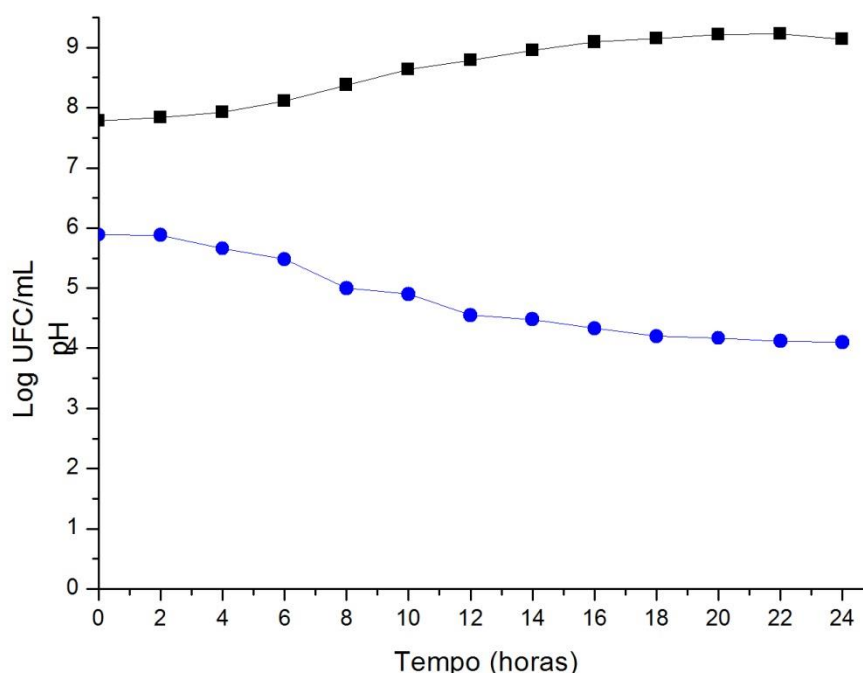
No caso das estirpes em co-cultura, verificou-se também um decréscimo do valor de pH, aproximadamente de dois valores de 5,81 passou para 3,85, no final da fermentação. Estes valores foram muito semelhantes aos valores obtidos no final das fermentações, com as estirpes em mono-cultura.

A nível individual, observou-se que a bactéria dominante, embora ligeiramente foi *Leuc. mesenteroides*, até às 12 horas de fermentação, sendo que no final da fermentação, *L. plantarum* passou a dominar, embora de modo pouco apreciável.

Estes resultados revelam-se de acordo com o que está descrito na fermentação para a produção da *choucroute* (Steinkraus, 1997; Gardner *et al.*, 2001; Hutkins, 2006).

### 3.3.3.2. Molho de beterraba

Na figura 13, é possível observar o decorrer da fermentação do sumo de beterraba, por *L. pentosus*.



**Figura 13** - Monitorização dos valores de pH e Log UFC/mL em sumo de beterraba fermentado por *Lactobacillus pentosus* para obtenção de molho para salada. *L. pentosus* (3964) (Log UFC/mL) (■) e pH (●).

Tal como anteriormente, verificou-se que a fase exponencial do crescimento microbiano ocorreu nas primeiras 12 horas de fermentação. A fermentação iniciou-se com cerca de 7,8 Log UFC/mL de *L. pentosus* e às 12 horas passou para 8,8 Log UFC/mL e às 24 horas para cerca de 9,1 Log UFC/mL.

Relativamente ao valor de pH, observou-se um decréscimo mais pronunciado até às 12 horas de fermentação. Inicialmente o valor era de 5,9. Às 12 horas de 4,6 e depois manteve-se relativamente estável até às 24 horas com um valor final de 4,10.

Ao analisar os resultados dos ensaios de fermentação preliminares, verificaram-se variações nos valores iniciais de pH. Esta discrepância de valores é justificada pelo

facto, já anteriormente referido, da utilização de matérias-primas com origens diferentes, nos diferentes ensaios. No quadro seguinte, estão apresentados os resultados relativos ao consumo de açúcares durante as diferentes fermentações dos sumos.

**Quadro 12** - Monitorização dos valores de açúcares totais, nos três sumos fermentados.

Fermentados		Bebida (10% Beterraba + 40% cenoura + 50% maçã)	Molho de beterraba e cenoura (20% beterraba + 80% cenoura)	Molho de beterraba (100% beterraba)
Açúcares Totais (g/L)	t0	99,8	80,6	57,1
	t12	92,9	71,9	43
	t24	78,7	66,9	42,7
% redução após 24 horas		21,1	17	25,2

Como seria de esperar, analisando o quadro 12, verificou-se uma redução de açúcares totais, durante a fermentação. O mesmo se verificou para os açúcares redutores (resultados não apresentados). No entanto, este consumo de açúcares foi, em geral, mais pronunciado a partir das 12 horas de fermentação.

Em geral, observa-se, também, que dos três sumos fermentados, o destinado a bebida, foi o que apresentou maior quantidade inicial de açúcares totais e açúcares redutores. Este resultado mostra-se de acordo com INSA (2007), visto que este produto é o único que possui na sua constituição sumo de maçã (50%), sendo a maçã, dos três hortofrutícolas utilizados, aquele que apresenta mais açúcar na sua constituição. Já o sumo destinado a molho de beterraba foi o que apresentou menor quantidade inicial de açúcares na sua constituição. De facto, segundo os autores, a beterraba é o hortofrutícola que possui menor teor de açúcares (totais e redutores). Embora este hortofrutícola apresente na sua constituição maior quantidade de açúcares totais do que açúcares redutores, comparando com a cenoura e a maçã.

No sumo destinado a bebida fermentada, verificou-se uma redução de açúcares totais de cerca de 21%, ao fim de 24 horas de fermentação.

Concluindo, a fermentação reduziu o teor de açúcares totais do sumo para bebida em cerca de 20%, enquanto que no caso dos molhos para salada esta redução foi cerca de 50%.



### 3.3.4. Avaliação sensorial aos sumos fermentados

Uma das alterações mais notórias após a esterilização, foi a alteração da cor dos sumos. No sumo de cenoura, a alteração de cor não foi tão evidente quanto no sumo de beterraba. Observou-se que a cor vermelho-sangue do sumo natural de beterraba, com a esterilização, passou a ser menos viva, para uma cor mais rosada. Yoon *et al.* (2005) verificaram que a mudança de cor dos sumos de beterraba era de vermelho-rosa para castanho. Este mesmo efeito, também é referido em Ravichandran *et al.* (2013) que afirmam que quanto maior a temperatura do tratamento térmico maior a perda de betalaínas. De acordo com Ravichandran *et al.* (2013), após um tratamento térmico a 125 °C durante 30 minutos ocorre um decréscimo de 81% de betacianinas e uma perda de 73% de betaxantinas.

No entanto, se anteriormente se verificou que a cor tinha sido ligeiramente alterada com a esterilização dos sumos, constatou-se que no decorrer da fermentação, a cor voltou a aproximar-se da cor inicial. De acordo com Klewicka *et al.* (2004), a reconstrução parcial da cor é devida ao decréscimo do valor de pH. Segundo Stintzing & Carle (2007), o sumo de beterraba após exposição térmica deve ser armazenado no frio, por forma a permitir a regeneração da cor das betacianinas. Estes autores consideram este procedimento (armazenagem no frio) essencial. De facto, verificou-se uma alteração da cor destes sumos para a cor original, o que pode ser explicado por estes dois motivos apresentados.

Sendo o frio um pré-requisito após tratamento térmico dos sumos, também pode ser o frio a explicação da constatação que após a fermentação dos sumos, o aroma apresentado por estes era diferente. Quando realizada a avaliação sensorial, logo após o término da fermentação, e quando realizada a avaliação sensorial após um tempo de armazenagem (congelação).

### 3.4. Teor fenólico e actividade antioxidante

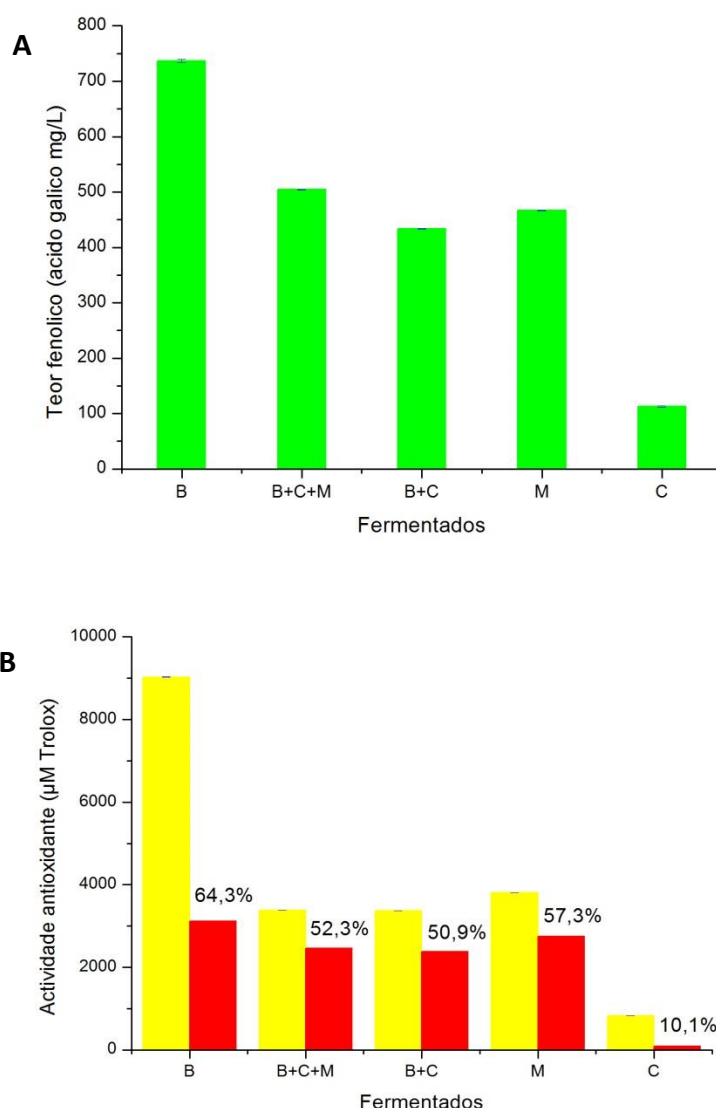
O teor fenólico de cada amostra foi expresso em ácido gálico (mg/L). Os valores obtidos para o sumo de beterraba para molho para salada foram de 736,7 mg, o sumo de beterraba, cenoura e maçã para a bebida apresentou 504,1 mg e o sumo de beterraba e cenoura para o molho para salada, apresentou um teor fenólico de 433,4 mg de ácido gálico/L (Figura 14).

Quanto à determinação de actividade antioxidante nos três produtos, foram utilizados dois métodos. No método DPPH, o resultado foi expresso em % de RSA. No entanto, para comparação com o método FRAP utilizou-se a equação de recta obtida e

substituiu-se o resultado obtido de % RSA para determinação de  $\mu\text{M}$  Trolox, como já foi referido no ponto 2.6.9.1.

O sumo fermentado para molho de beterraba para salada foi aquele que apresentou maior capacidade antioxidante (63,8%), seguido do sumo fermentado para bebida de beterraba, cenoura e maçã (52,3%) e por último o sumo fermentado para salada de beterraba e cenoura (50,9%). Em termos de concentração em Trolox, o molho para salada de beterraba apresentou 3121,6  $\mu\text{M}$ , seguido de 2464,8  $\mu\text{M}$  de Trolox para a bebida e por fim 2381,7  $\mu\text{M}$  de Trolox para o molho para salada de beterraba e cenoura (Figura 14).

Quanto ao método FRAP, mais uma vez o sumo fermentado para molho para salada de beterraba foi o que apresentou maior actividade antioxidante, com cerca de 9030  $\mu\text{M}$  Trolox, seguido pelo sumo fermentado para bebida de beterraba, cenoura e maçã com 3375,6  $\mu\text{M}$  Trolox e por fim o molho para salada de beterraba e cenoura apresentou um valor de 3370  $\mu\text{M}$  Trolox (Figura 14).



**Figura 14- A** - Teor fenólico (ácido gálico (mg/L)) e **B**- capacidade antioxidante (µM Trolox), nos cinco sumos fermentados.

Método FRAP (Amarelo) e método DPPH (Vermelho). B- sumo de beterraba, B+C+M – sumo de beterraba, cenoura e maçã, B+C – sumo de beterraba e cenoura, M – sumo de maçã e C- sumo de cenoura.

Por cima das barras do DPPH estão indicadas as percentagens de actividade antioxidante.

Para confirmação do impacto de cada matéria-prima, a nível do teor fenólico e antioxidante, foram realizados estes três métodos para o sumo de maçã fermentada e para o sumo de cenoura fermentado sem qualquer mistura.

A maçã apresentou 467,1 ácido gálico (mg/L) face a 112,7 ácido gálico (mg/L) apresentado para a cenoura. Verificou-se que o teor fenólico do fermentado de maçã, foi superior ao teor fenólico do molho para salada de beterraba e cenoura, que foi de 433,4 ácido gálico (mg/L). Estes resultados mostram-se relevantes no sentido da comparação com os três fermentados para obtenção dos produtos finais. Isto

demonstra que o sumo de maçã no fermentado destinado a bebida foi o factor decisivo em tornar este produto o segundo com o maior teor fenólico, uma vez que esta possui na sua constituição 50% de sumo de maçã (Figura 14).

Quanto ao método FRAP, a amostra de maçã apresentou 4038,8  $\mu\text{M}$  Trolox e a amostra de cenoura apresentou 825,1  $\mu\text{M}$  Trolox. Comparando uma vez mais, os três produtos produzidos, verificou-se que a amostra de maçã por si só, possui maior capacidade antioxidante face ao molho para salada de beterraba e cenoura que possui 3770  $\mu\text{M}$  Trolox.

Relativamente ao método DPPH, comprovou-se o esperado. O sumo de maçã apresentou maior actividade antioxidante do que o sumo de cenoura: a amostra de maçã apresentou 57,3% de actividade antioxidante, o que corresponde a 2751,3  $\mu\text{M}$  Trolox e a amostra de cenoura apresentou 10,1% de actividade antioxidante, o que corresponde a 88,3  $\mu\text{M}$  Trolox.

Não foram encontrados trabalhos para comparar os resultados obtidos neste trabalho. No entanto, segundo Ignat *et al.* (2011) o teor de fenólicos presente num sumo de maçã comercial é de 339  $\pm$  43 ácido gálico (mg/L). Este valor não é muito diferente do obtido, embora que, este seja para um sumo comercial e neste trabalho, os sumos foram todos fermentados. Este mesmo autor afirma que a maçã é uma das principais fontes alimentares de compostos fenólicos.

Em geral, observando a figura 14, verificou-se que o sumo fermentado para molho de beterraba para salada foi aquele que possuiu maior teor fenólico e também a maior capacidade antioxidante. Este resultado mostrou-se de acordo com Ravichandran *et al.* (2013), os quais afirmam que a beterraba pode ser usada como antioxidante.

Segundo estes autores, a actividade antioxidante das betalaínas é maior do que a actividade antioxidante do ácido ascórbico. O molho para salada de beterraba é constituído por 100% de sumo de beterraba, logo possui maior quantidade de betalaína que os outros dois produtos, o sumo de beterraba é inferior a 50%, logo não possuem tanta betalaína. Mas isto também evidencia que nem todos os compostos fenólicos têm a mesma capacidade antioxidante.

Ainda ao visualizar a figura 14, verifica-se uma discrepância de resultados obtidos no método FRAP, nomeadamente entre o fermentado destinado a molho de beterraba para salada o qual foi de aproximadamente 9000  $\mu\text{M}$  Trolox, enquanto para os outros fermentados a capacidade foi inferior a metade deste valor. Esta discrepância justifica-

se pelo facto de cada um dos métodos se basear em fundamentos diferentes. Além disso, normalmente o método FRAP apresenta resultados superiores aos resultados do método DPPH.

Observando ainda a figura 14, verifica-se que os desvios-padrão apresentados apresentam valores muito baixos ( $\leq 1$ ), sendo por isso de difícil visualização no gráfico. Estes resultados enfatizam a reprodutibilidade destes métodos.

Não foram encontrados na bibliografia resultados relativos ao teor fenólico e actividade antioxidante destes produtos fermentados, pelo que não foi possível fazer uma comparação entre os resultados deste trabalho e outros. No entanto, existe um estudo sobre *smoothies* que faz referência a estes métodos.

De acordo com o artigo, sendo os *smoothies* sumos fermentados de vários frutos e vegetais, um pouco semelhantes aos sumos fermentados neste trabalho, comparou-se em alguns aspectos de forma a ter uma noção sobre os resultados. Assim, de acordo com este artigo (Di Cagno *et al.*, 2011), o teor fenólico obtido situa-se entre os 400 e 500 mg de ácido gálico/L, no caso dos *smoothies* verdes, e entre os 700 a 800 mg de ácido gálico/L no caso dos *smoothies* vermelhos. Ao comparar estes valores com os obtidos neste trabalho, verificou-se que os resultados são muito semelhantes.

No molho para salada de beterraba, o teor fenólico obtido foi de 736,69 de ácido gálico (mg/L) o que se enquadra no valor obtido para os *smoothies* vermelhos. Já para o molho de baterraba e cenoura, o valor obtido foi de 433,44 de ácido gálico (mg/L) e na bebida foi 504,09 de ácido gálico (mg/L), o que corresponde ao intervalo obtido nos *smoothies* verdes. Em relação ao valor de RSA, pelo método DPPH os valores situam-se entre 60 a 70% no caso dos *smoothies* vermelhos, neste trabalho o valor de RSA para o molho de beterraba foi de 63,8%. No caso dos *smoothies* verdes, os valores obtidos foram 40 a 50%. Neste trabalho, para o molho para salada de beterraba e cenoura o valor obtido foi de 50,9% e para a bebida de 52,3%.

Em Di Cagno *et al.* (2011), tal como neste trabalho, os sumos dos hortofrutícolas foram esterilizados antes da fermentação, o que faz com que sejam os resultados mais adequados para comparação, visto que o tratamento térmico foi praticamente igual (difere em 5 minutos) e as condições de fermentação iguais, diferindo apenas nas misturas de hortofrutícolas utilizadas.

### 3.5. Formulação dos produtos finais

Para a escolha do tipo de azeite a utilizar nos fermentados destinados a molhos constatou-se que o azeite clássico (Oliveira da Serra) foi a melhor opção, pois não era tão intenso como outros azeites experimentados, uma vez que não escondeu o verdadeiro sabor dos molhos elaborados. Inicialmente foi testada na proporção 1:2 (azeite:molho) e verificou-se que não era a melhor proporção visto que sobressaia o sabor do azeite em detrimento do fermentado.

Foram testados três emulsionantes (Tween 20, Methocel e Sucrose) em que os resultados não foram o esperado, pelo que se optou pela não adição de emulsionante à mistura.

Por outro lado, uma vez que o sumo de beterraba, é 100% beterraba, estes resultados indicam que a beterraba na sua constituição deve ter um composto com capacidade emulsionante. Verificou-se uma capacidade emulsionante maior no molho para salada de beterraba e cenoura (20% de sumo de beterraba e 80% de sumo de cenoura). Este facto vai de encontro, às afirmações de Nitschke & Pastore (2002), que indicam que a betaína é um aminoácido presente na beterraba e que faz parte do principal grupo de emulsionantes de origem sintética.

Segundo Di Mattia *et al.* (2010), a eficácia do emulsionante, bem como as propriedades de dispersão e a estabilidade oxidativa dos sistemas emulsionados de azeite, deve-se à natureza e às propriedades físico-químicas dos compostos fenólicos presentes.

Quando se procedeu à avaliação sensorial dos molhos, com os três tipos de emulsionante, verificou-se que os três alteravam o sabor dos molhos. Concluiu-se que não deveria adicionar-se nenhum emulsionante e no caso da comercialização, deveria ser colocado no rótulo da embalagem a inscrição “Agitar antes de utilizar”.

Uma vez que se verificou, que a não utilização de nenhum emulsionante, era a solução mais viável, foram testadas as melhores proporções de azeite e fermentado. A proporção de 1:5 (azeite: fermentado), foi a melhor para ambos os molhos produzidos.

Quanto à adição de óleo essencial de oregãos, nos dois molhos para salada, após terem sido testadas várias concentrações, concluiu-se que a melhor concentração a usar foi de 0,002% (v/v). Relativamente à bebida, a melhor concentração a incorporar de óleo de *Mentha cervina* foi também a de 0,002% (v/v).

### **3.6. Avaliação do tempo de vida útil**

Procedeu-se a uma avaliação do tempo de vida útil dos três produtos após fermentação, no sentido de avaliar a necessidade de esterilização posterior à fermentação, antes do consumo destes produtos.

Para os três sumos fermentados, foram avaliados o tempo de vida útil destes após fermentação e armazenagem em refrigeração (7 °C) e em simultâneo, no caso dos molhos para salada, o tempo de vida útil dos sumos que, após fermentação, foram esterilizados, parte dos sumos armazenados em refrigeração e outra parte armazenados a temperatura ambiente.

Esta avaliação incluiu a determinação do valor de pH, o plaqueamento das amostras em placas de MRS e a avaliação sensorial dos produtos.

#### **3.6.1. Sumos fermentados para obtenção de bebida e molhos para salada**

Esta avaliação foi realizada durante 26 dias, para o fermentado para bebida e durante 24 dias, para os fermentados para molhos. Para os três fermentados apenas refrigerados após fermentação, não foram considerados os resultados a partir do 12º dia de armazenagem, uma vez que através da avaliação sensorial, verificou-se que não apresentavam as características sensoriais desejáveis para consumo (Quadros 13, 14 e 15).

Quanto aos sumos que foram esterilizados após a fermentação e, posteriormente, armazenados em refrigeração, verificou-se que o sabor, desde o primeiro dia de armazenagem, era pior, comparativamente aos sumos que não tinham sido esterilizados.

Nos quadros 13, 14 e 15, apresentam-se as avaliações sensoriais realizadas, no que diz respeito a cor, aroma e sabor, para os três sumos fermentados produzidos, com e sem esterilização após a fermentação.

**Quadro 13** - Avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenagem (7 °C), do fermentado para bebida, esterilizado e não esterilizado, após fermentação

Fermentado sem esterilização				Fermentado com esterilização		
Tempo (dias)	Cor	Aroma	Sabor	Cor	Aroma	Sabor
1	Púrpura	Bom, característico do sumo fermentado	Doce, agradável	Alaranjado	Cozido	Doce, mas não o sabor original
3	Púrpura	Bom, característico do sumo fermentado	Doce, agradável	Alaranjado	Cozido	Doce, mas não o sabor original
5	Púrpura	Bom, característico do sumo fermentado	Doce, agradável	Alaranjado	Cozido	Menos doce
7	Púrpura	Bom, característico do sumo fermentado	Doce, agradável	Alaranjado escuro	Cozido	Menos doce, estranho
9	Púrpura	Bom, característico do sumo fermentado	Doce, agradável	Alaranjado escuro	Cozido	Menos doce, estranho
12	Púrpura	Bom, característico do sumo fermentado	Ligeira alteração, menos doce	Alaranjado escuro	Cozido	Menos doce, estranho

**Quadro 14** - Avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenagem (7 °C), do fermentado de beterraba e cenoura para molho, esterilizado e não esterilizado, após fermentação

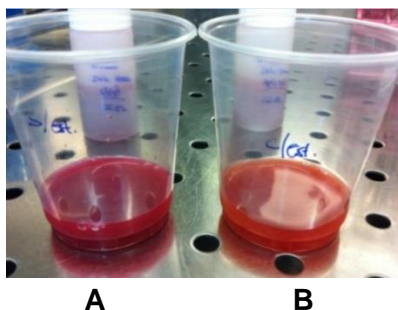
Fermentado de beterraba e cenoura sem esterilização				Fermentado de beterraba e cenoura com esterilização		
Tempo (dias)	Cor	Aroma	Sabor	Cor	Aroma	Sabor
1	Vermelho escuro	Bom	Bom	Vermelho	Cozido	Intenso. Não é o sabor original
3	Vermelho escuro	Bom	Bom	Vermelho	Caramelo	Não agradável
5	Vermelho escuro	Bom	Bom	Vermelho	Cozido	A ficar desagradável
7	Vermelho escuro	Bom	Bom, tem pico ácido	Vermelho	Cozido	Não agradável
9	Vermelho escuro	Bom	Bom, tem pico ácido	Vermelho	Cozido	Mau
12	Vermelho escuro	Bom	A ficar mais ácido	Vermelho	Cozido	Mau



**Quadro 15** - Avaliação sensorial, ao longo do tempo de armazenagem (7 °C), de fermentados de beterraba para molho, esterilizado e não esterilizado, após fermentação

Tempo (dias)	Fermentado de beterraba sem esterilização			Fermentado de beterraba com esterilização		
	Cor	Aroma	Sabor	Cor	Aroma	Sabor
1	Vermelho (sangue)	Bom, beterraba	Doce, beterraba	Vermelho (mais claro)	Cozido	Doce, mas diferente do sabor original
3	Vermelho (sangue)	Bom, beterraba	Doce, beterraba	Vermelho (mais claro)	Cozido	Doce, a beterraba cozida
5	Vermelho (sangue)	Bom, beterraba	Doce, beterraba	Vermelho (mais claro)	Cozido	Doce, a beterraba cozida
7	Vermelho (sangue)	Bom, beterraba	Doce, beterraba	Vermelho (mais claro)	Cozido	Menos doce
9	Vermelho (sangue)	Bom, beterraba	Doce, beterraba	Vermelho (mais claro)	Cozido	Beterraba cozida
12	Vermelho (sangue)	Bom, beterraba	Doce, beterraba	Vermelho (mais claro)	Cozido	Desagradável

A primeira característica diferenciadora entre os sumos fermentados não esterilizados e os esterilizados, como já foi referido anteriormente, foi a cor (Figuras 15 e 16).



**Figura 15** - Diferença de cor entre fermentados destinados a bebida, no 1º dia de armazenagem (Fotografia por Susana Silvério)

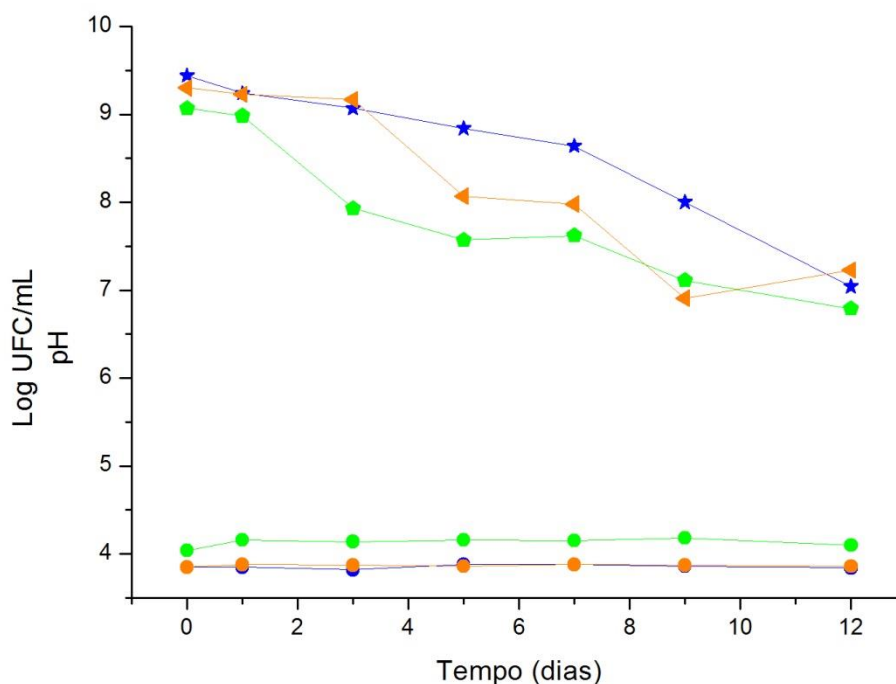
**A** - sumo após fermentação sem esterilização posterior, e **B** - sumo após fermentação com esterilização posterior



**Figura 16-** Diferença de cor entre os fermentados destinados a molhos para salada, no 1º dia de armazenagem (Fotografias por Susana Silvério)

**A** - Molho de beterraba e cenoura, à esquerda após fermentação seguida de esterilização e à direita após fermentação sem esterilização posterior; **B** - Molho de beterraba, à esquerda com esterilização após fermentação e à direita sem esterilização, após fermentação.

Na figura 17, apresentam-se os resultados relativos à avaliação da estabilidade microbiológica e de pH, em armazenagem, para os três sumos fermentados destinados a bebida e a molhos para salada, sem esterilização e armazenados em refrigeração.



**Figura 17-** Avaliação da estabilidade, em armazenagem, a 7 °C, do fermentado para bebida e dos fermentados para molhos.

*Lactobacillus plantarum* (3960), em bebida (Log UFC/mL) (★); *Lactobacillus plantarum* (3960) e *Leuconostoc mesenteroides* (3963) em molho de beterraba e cenoura (Log UFC/mL) (▲); *Lactobacillus pentosus* (3964) em molho de beterraba (Log UFC/mL) (◆); pH do fermentado por *Lactobacillus plantarum* para bebida (◆); pH do fermentado por *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides* para molho de beterraba e cenoura (▲) e pH do fermentado por *Lactobacillus pentosus* do molho de beterraba (◆).

Observando a figura acima, verificou-se uma redução das bactérias lácticas ao longo do tempo.

No fermentado destinado a bebida, inicialmente o valor de bactérias lácticas correspondia a cerca de 9,4 Log UFC/mL, no 12º dia de armazenagem o valor correspondente foi de 7 Log UFC/mL o que mostrou um decréscimo superior a 2 Log UFC/mL. Quanto ao fermentado para molho de beterraba e cenoura, o valor total de bactérias lácticas inicial no fermentado foi de 9,3 Log UFC/mL e no 12º dia de armazenagem passou para 7,2 Log UFC/mL, verificando-se um decréscimo de cerca de 2 Log. Relativamente ao molho de beterraba, o valor inicial de bactérias foi de 9,1 Log UFC/mL e ao fim de 12 dias de armazenagem a 7 °C, o valor correspondente foi de 6,8 Log UFC/mL, o que corresponde a um decréscimo superior a 2 Log, tal como no sumo para bebida.

Relativamente ao valor do pH, observou-se que para os três fermentados o valor se manteve relativamente constante. No caso dos fermentados para bebida e para molho de beterraba e cenoura, o valor de pH foi semelhante entre (3,82 e 3,88). No molho de beterraba o valor de pH situou-se entre 4,04 e 4,18.

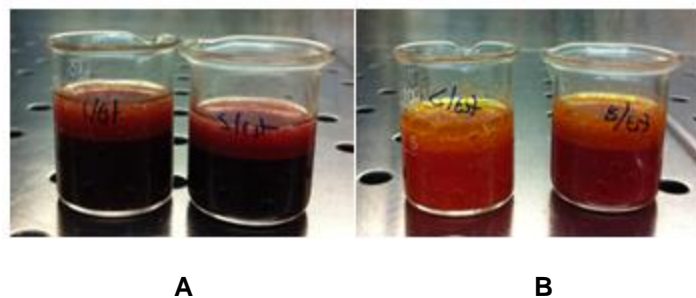
Quanto aos fermentados que sofreram esterilização, não foi observado qualquer crescimento em placa ao longo dos dias, o que mostra que a esterilização foi eficaz. O valor de pH não sofreu alteração apreciável com a esterilização. Em relação ao sabor, estes sumos mostraram-se muito diferentes e desagradáveis comparados com o sabor dos sumos fermentados que não sofreram esterilização.

### **3.6.2. Molhos para salada**

Relativamente à segunda fase de avaliação da estabilidade dos produtos, esta avaliação foi realizada somente em produtos destinados a molhos para salada já como produto final, ou seja, foram avaliados os fermentados incorporados com a respectiva quantidade estipulada de azeite e óleo essencial de orégãos. Nesta fase, tal como na primeira, a armazenagem foi efectuada de igual forma (7 °C), excepto nos produtos esterilizados, os quais em vez de serem mantidos em refrigeração, foram mantidos à temperatura ambiente controlada (25 °C) e protegidos da luz.

Esta avaliação foi realizada durante 28 dias, sendo que para o molho de beterraba e cenoura para salada foi apenas até ao 18º dia de armazenagem, uma vez que a partir daí já não possuía as características sensoriais desejáveis. O molho de beterraba foi avaliado durante os 28 dias de armazenagem, já que este produto manteve excelentes características sensoriais.

Relativamente à cor, tal como sucedeu na primeira fase de avaliação, verificou-se uma alteração. No entanto, uma vez mais, foi mais apreciável no molho de beterraba e cenoura do que no molho de beterraba para salada (Figura 18).



**Figura 18** - Visualização de cor do produto final no 1º dia de armazenagem (Fotografias por Susana Silvério)

**A** - Molho de beterraba para salada, à esquerda com esterilização após fermentação e à direita sem esterilização após fermentação; **B** - molho de beterraba e cenoura para salada, à esquerda com esterilização após fermentação e à direita sem esterilização após fermentação

Nos quadros 16 e 17, apresentam-se os valores de Log UFC/mL e os resultados das avaliações sensoriais realizadas, no que diz respeito a cor, aroma e sabor, para os dois molhos como produtos finais, com e sem esterilização após fermentação.

**Quadro 16** - Avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenagem, relativo ao produto final molho de beterraba e cenoura para salada esterilizado e não esterilizado, após fermentação

Molho de beterraba e cenoura para salada sem esterilização (7 °C)					Molho de beterraba e cenoura para salada com esterilização (25 °C)			
Tempo (dias)	Cor	Aroma	Sabor	Log UFC/mL	Cor	Aroma	Sabor	Log UFC/mL
<b>0</b>	Vermelho Tomate	Bom para molho	Bom, com pico ácido	9,2	Alaranjado	Bom	Cozido, menos ácido	<10
<b>3</b>	Vermelho Tomate	Bom para molho	Bom, com pico ácido	9,1	Alaranjado	Bom	Cozido, menos ácido	<10
<b>7</b>	Vermelho Tomate	Bom para molho	Bom, com pico ácido	7,9	Alaranjado	Bom	Cozido, menos ácido	<10
<b>10</b>	Vermelho Tomate	Bom para molho	Bom, com pico ácido	7,5	Alaranjado	Diferente do dia 0	Acido	<10
<b>14</b>	Vermelho Tomate	Bom para molho	Bom, com pico ácido	7,4	Alaranjado	Diferente do dia 0	Ácido	<10
<b>18</b>	Vermelho Tomate	Bom para molho	Ácido	7,4	Alaranjado	Diferente do dia 0	Ácido	<10

**Quadro 17** - Avaliação sensorial ao longo do tempo de armazenagem, relativo ao produto final molho de beterraba para salada esterilizado e não esterilizado, após fermentação

Molho de beterraba para salada sem esterilização (7 °C)					Molho de beterraba para salada com esterilização (25 °C)			
Tempo (dias)	Cor	Aroma	Sabor	Log UFC/mL	Cor	Aroma	Sabor	Log UFC/mL
0	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	9	Vermelho-laranja	Diferente do original	Doce, mas não é o sabor original	<10
3	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	8,2	Vermelho-laranja	Bom mas, diferente do original	Menos doce	<10
7	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	7,2	Vermelho-laranja	Bom mas, diferente do original	Menos doce	<10
10	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	6,8	Vermelho-laranja	Diferente do original	Menos saboroso	<10
14	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	6,2	Vermelho-laranja	Diferente do original	Menos saboroso	<10
18	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	6,2	Vermelho-laranja	Sem aroma	Ácido /desagradável	<10
21	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	5,9	Vermelho-laranja	Sem aroma	Ácido /desagradável	<10
25	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	5,7	Vermelho-laranja	Sem aroma	Desagradável	<10
28	Vermelho (sangue)	Bom, característico de molho	Bom/Doce	5,2	Vermelho-laranja	Sem aroma	Desagradável	<10

Relativamente ao comportamento das bactérias lácticas no produto fermentado, ao analisar os quadros 16 e 17, verifica-se que no molho de beterraba e cenoura, o valor inicial de bactéria láctica correspondia a cerca de 9,2 Log UFC/mL, e ao fim dos 18 dias o valor foi cerca de 7,4 Log UFC/mL o que não chega a um decréscimo de 2 Log. Em relação ao molho de beterraba para salada, o valor inicial de bactéria láctica corresponde a cerca de 9 Log UFC/mL e diminuiu aproximadamente 4 Log UFC/mL, até aos 28 dias. Verificou-se ainda, que o decréscimo foi maior no molho de beterraba, em relação ao molho de beterraba e cenoura, pois no 18º dia de armazenagem, o valor de bactéria láctica presente no molho de beterraba era cerca de 6,2 Log UFC/mL face aos 7,5 Log UFC/mL do mesmo dia no molho de beterraba e cenoura.

O molho de beterraba, esterilizado após fermentação, não apresentou crescimento microbiano, tendo sido a esterilização eficaz. Ao nível da avaliação sensorial, principalmente em relação ao sabor, verificou-se, tal como aconteceu na 1ª fase da avaliação da estabilidade microbiológica, que os produtos esterilizados são muito diferentes e piores do que os produtos não esterilizados.

Após estas avaliações realizadas à estabilidade dos produtos em armazenagem, constatou-se claramente, que a incorporação do azeite e do óleo essencial nos produtos, foi uma mais-valia, não só pela manutenção e melhoramento do sabor e aroma dos produtos, como também proporcionou um maior tempo de prateleira aos mesmos, principalmente no caso do molho de beterraba. Enquanto, nos sumos fermentados, sem qualquer adição, o período de vida útil foi de 12 dias, com a incorporação do azeite e do óleo essencial, o período de vida útil aumentou, para 18 dias, no caso do molho de beterraba e cenoura, enquanto que o molho de beterraba continuava com excelentes características ao 28º dia.

De acordo com a bibliografia, tanto o azeite como os óleos essenciais são ricos em antioxidantes e possuem compostos que permitem a própria conservação destas matérias-primas. Segundo Olmedo *et al.* (2013), o óleo essencial de orégãos apresenta uma capacidade antioxidante de 60% e, relativamente aos compostos fenólicos, apresenta cerca de 18,3 mg ácido gálico/L. Pode-se concluir que são valores apreciáveis e que ajudam a explicar o aumento de tempo de prateleira verificado na segunda avaliação. Aliás, os autores descrevem a capacidade antimicrobiana natural dos óleos essenciais como “uma nova forma de preservação”.

Concluiu-se que, no caso da bebida, consoante o nicho de mercado, devem-se ter em conta vários aspectos. Se a bebida for dirigida a um nicho de mercado, no qual os consumidores privilegiem uma bebida que seja a mais próxima das características



naturais, a esterilização que é efectuada após a fermentação deve ser uma esterilização que não envolva tratamento térmico. O tratamento mais próximo ao da esterilização será a utilização das altas pressões hidrostáticas. Esta será sempre a melhor opção, no entanto é uma tecnologia que é dispendiosa e irá encarecer o produto final.

Por outro lado, se a bebida for comercializada para um nicho de mercado em que os consumidores tenham outras preferências, tais como maior estabilidade do produto, menos açúcar disponível, entre outras características; a opção será a esterilização após a fermentação para eliminar as bactérias lácticas.

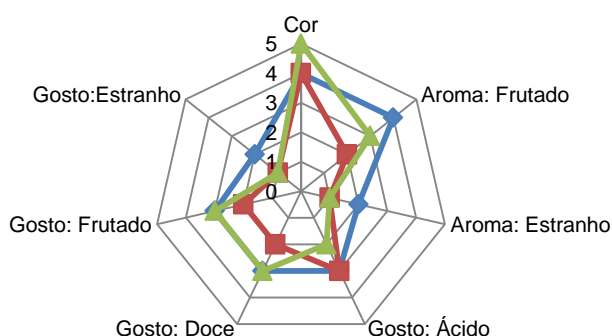
Relativamente aos molhos para salada, a esterilização a frio seria a melhor opção, visto que uma esterilização a quente altera as características organolépticas dos produtos. Estes produtos que, normalmente, não são utilizados diariamente, precisam de ter estabilidade microbiológica por um período de tempo mais alargado.

### 3.7. Análise sensorial

O desenvolvimento de novos produtos alimentares exige sempre uma análise sensorial, de forma a avaliar a reacção e a aceitação destes novos produtos por parte do potencial consumidor alvo e, simultaneamente, avaliar o mercado potencial do produto. Assim, é necessária a opinião do consumidor para aperfeiçoar o produto, caso seja necessário, para que este corresponda às suas expectativas.

Esta análise foi efectuada aos três produtos fermentados, sem esterilização posterior.

Os resultados da análise sensorial dos três produtos fermentados, observam-se nas figuras 19 a 21.

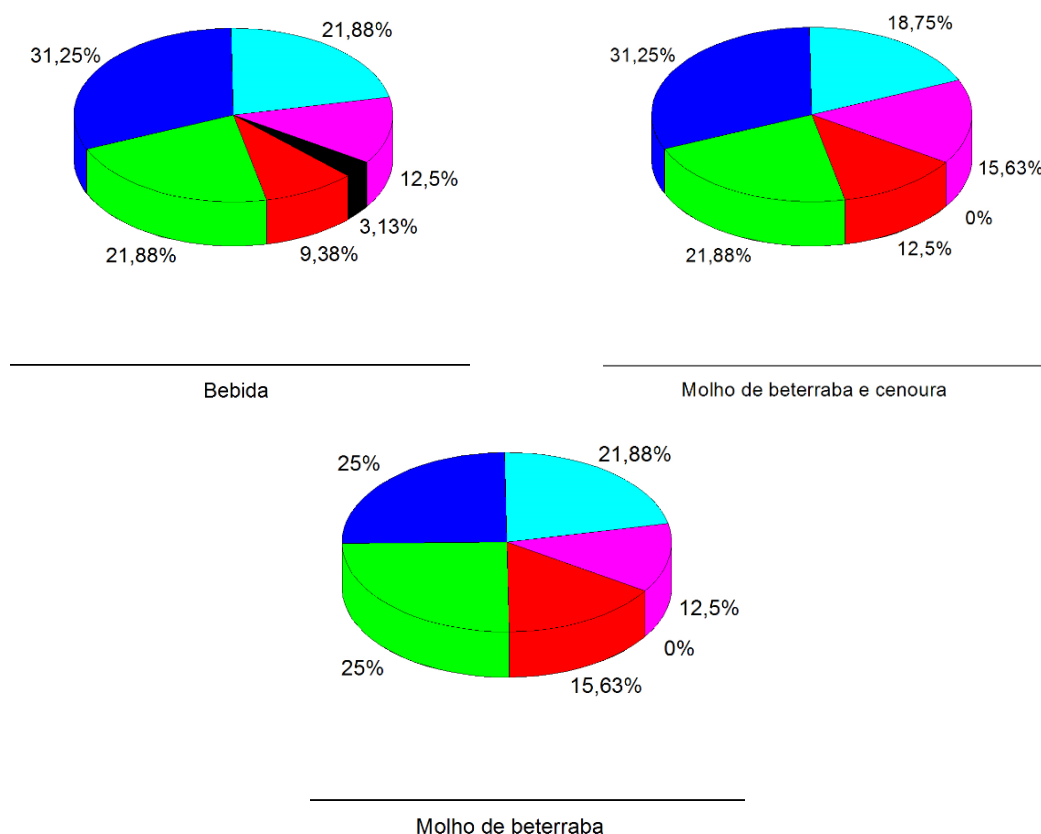


**Figura 19** - Atributos sensoriais da bebida e dos molhos fermentados

Bebida (—●—) Molho para salada de beterraba e cenoura (—■—) Molho para salada de beterraba (—▲—) e [0- Pouco, 1-Ligeiro, 2- Moderado, 3- Forte, 4- Intenso e 5- Muito intenso].

Através da análise da figura 19, observa-se que os três produtos apresentam uma cor intensa. Verifica-se que a bebida e o molho para salada de beterraba apresentam gosto frutado e doce e aroma frutado. No que respeita ao gosto e ao aroma estranho, estes atributos foram mais evidenciados na bebida do que nos molhos, no entanto obtiveram sempre baixas pontuações. Uma análise conjunta permite observar que a bebida e os molhos desenvolvidos apresentam um perfil sensorial onde se destaca o frutado e o doce, atributos por norma bem aceites pelo consumidor (português).

É de realçar algumas observações que os provadores fizeram em relação aos três produtos. Os provadores que gostaram dos produtos salientaram a leveza e a suavidade tanto em relação ao aroma como ao sabor, e quanto ao sabor ainda consideraram os três produtos muito saborosos. No caso da bebida, ainda referiram a frescura como um atributo positivo.

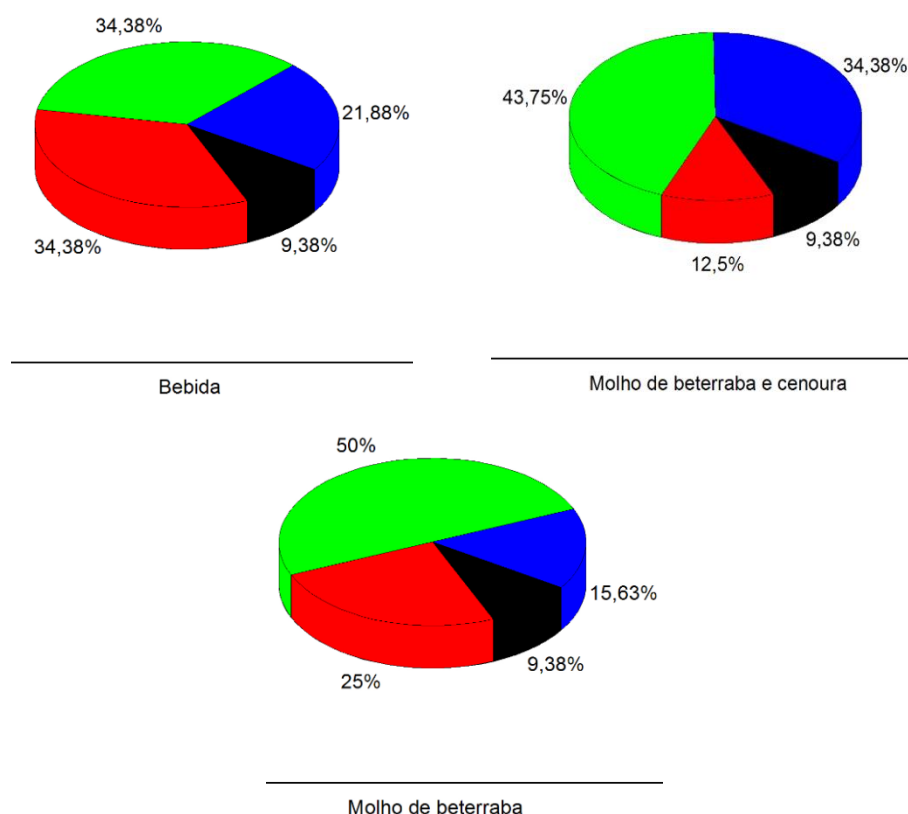


**Figura 20** - Apreciação global da bebida e dos molhos fermentados

(0%) Pésimo, (3,13%) Mau, (9,38%) Regular, (21,88%) Agradável, (21,88%) Bom e (31,25%) Excelente.

Não obstante o número de provadores ser apenas de 32, a maioria dos quais consumidores de produtos similares, foram incluídas duas questões de carácter hedónico: apreciação global e intenção de compra. No que respeita a apreciação

global, de acordo com a figura 20, é possível verificar que os três produtos foram bem apreciados (agradável, bom e excelente) por 65,6% de provadores no caso da bebida e do molho de beterraba e cenoura para salada e 59,4% de provadores no caso do molho de beterraba para salada.



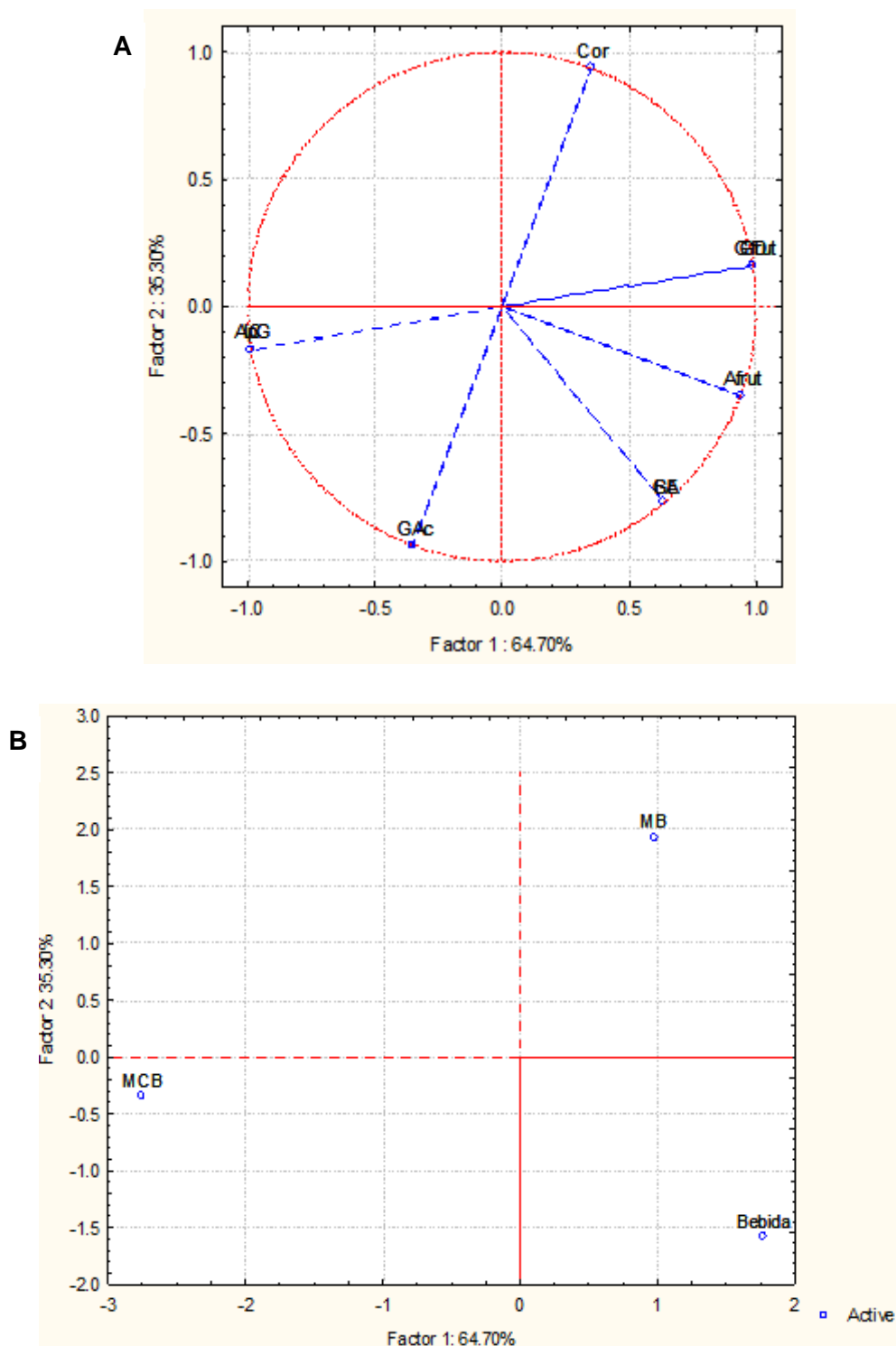
**Figura 21** - Intenção de compra dos três produtos

(■) Não compraria de certeza, (■) Provavelmente não compraria, (■) Provavelmente compraria e (■) Compraria de certeza.

Analisando a figura 21, verifica-se que a maioria dos provadores aderiu bem aos produtos propostos. É de notar, que 78,2% dos provadores “provavelmente comprariam” e “comprariam de certeza”, o molho de beterraba e cenoura para salada. Já o molho de beterraba para salada, 65,6% dos provadores também “provavelmente comprariam” e “comprariam de certeza”, e a bebida cerca de 56,3% dos provadores também “provavelmente comprariam” e “comprariam de certeza”.

De acordo com a análise sensorial efectuada e as sucessivas avaliações sensoriais realizadas ao longo do trabalho, constatou-se que a mais-valia destes produtos relativamente aos convencionais, não fermentados, deve-se principalmente ao aroma e sabor resultante da fermentação e à acidez do fermentado, que foram muito apreciados.

Com vista a uma análise global, os resultados foram submetidos a análise multivariada (Análise de Componentes Principais), cujos resultados se apresentam na figura 22.



**Figura 22** - Projecção dos atributos sensoriais (**A**) e dos produtos (**B**) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

Em **A**: **ApG** – Apreciação global, **GAc**- Gosto ácido, **Gfrut**- Gosto frutado, **GE** – Gosto estranho, **AE** – Aroma estranho, **Afrut** – Aroma frutado, **GD** – Gosto doce, **IC** – Intenção de compra.

Em **B**: **MB**- molho de beterraba, **MCB**- molho de cenoura e beterraba

As duas primeiras componentes principais explicam 100% da variabilidade total (nove variáveis), sendo que a primeira componente principal é definida pelos atributos: aroma frutado, gosto doce, gosto frutado e as variáveis hedónicas. A segunda componente principal é explicada pela cor, aroma e gosto estranho e gosto ácido. A análise da figura 22, confirma o que foi referido anteriormente.

Verifica-se assim, que os atributos gosto doce (**GD**) e gosto frutado (**Gfrut**) com valores idênticos e a **cor** (Fig. 22A) estão associados ao molho de beterraba (**MB**) (Fig 22B). A apreciação global (**ApG**), a intenção de compra (**IC**) e o atributo sensorial gosto ácido (**GAc**) (Fig. 22A) foram atribuídos ao molho de beterraba e cenoura (**MCB**) (Fig 22B). Quanto à **bebida** (Fig. 22B), os atributos sensoriais conferidos foram: aroma frutado (**Afrut**), aroma estranho (**AE**) e gosto estranho (**GE**) (Fig. 22A).

A análise sensorial efectuada permite verificar que o mercado está receptivo aos três produtos desenvolvidos. Contudo, esta receptibilidade afigura-se ainda maior se forem tidas em atenção as sugestões do painel e ligeiras alterações dos produtos. Para os três produtos, será necessário proceder-se a uma filtração. No caso dos molhos para salada, outro ajuste seria no sentido de experimentar outro tipo de emulsionantes, para não se verificar separação de fases, principalmente no molho para salada de beterraba e cenoura, e seria ainda de equacionar uma diminuição da quantidade de azeite. No molho de beterraba para salada, também poderia efectuar-se uma acidificação adicional.

#### 4. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objectivo o desenvolvimento de novos produtos à base de sumos hortofrutícolas fermentados por bactérias lácticas, sensorialmente apelativos e com impacto positivo no bem-estar e na saúde do consumidor. Pretendia-se uma bebida não alcoólica e de baixo teor de açúcares e dois molhos para salada de acidez natural, baixo teor de açúcares e baixo teor de lípidos.

Verificou-se que os três produtos atingiram às 24 horas de fermentação um valor de pH inferior e/ou igual a 4, o que contribuiu para a estabilidade microbiológica dos mesmos.

Em relação ao desenvolvimento das bactérias ao longo da fermentação, constatou-se que, para os três produtos, o crescimento foi semelhante, partindo de cerca de 8 Log UFC/mL e atingindo cerca de 9 Log UFC/mL, ao fim de 24 horas de fermentação.

Quanto aos açúcares, verificou-se uma diminuição destes nestes produtos, nomeadamente uma redução de açúcares totais de cerca de 21% na bebida e entre 17 e 25% nos molhos.

A opção pela esterilização ou pela refrigeração, após fermentação, dependerá da finalidade do produto e das características pretendidas.

Em relação ao teor fenólico e à capacidade antioxidante, confirmou-se que as três matérias-primas principais utilizadas neste trabalho, apresentavam elevado teor fenólico e poder antioxidante, e que os tratamentos térmicos e a fermentação não diminuíram estas características. Este facto demonstra a importância que estes produtos poderão vir a ter na Indústria Alimentar, devido à sua estabilidade, bem como às propriedades nutritivas e funcionais benéficas ao consumidor.

A introdução de azeite e óleo essencial de orégãos, nos molhos para salada e de óleo de *Mentha cervina* na bebida, contribuíram no sentido do melhoramento do aroma e do sabor dos fermentados produzidos, reforçando, eventualmente, a capacidade antioxidante destes produtos e melhorando o poder de conservação dos mesmos.

Através da análise sensorial, constatou-se que estes três produtos têm boa aceitabilidade de mercado e são os três potencialmente comercializáveis. Quanto à apreciação global, 65,6% dos provadores consideraram “agradável, bom e excelente” a bebida e o molho de beterraba e cenoura. Já para o molho de beterraba, a avaliação para os mesmos atributos foi de 59,4%. No que diz respeito à intenção de compra, 78,2% dos provadores “provavelmente comprariam” e “comprariam de certeza” o molho de beterraba e cenoura, 65,6% o molho de beterraba e 56,3% a bebida.

A análise multivariada efectuada confirmou os resultados obtidos na análise sensorial realizada.

Conclui-se assim, que os principais objectivos traçados neste trabalho foram alcançados.

Em termos de perspectivas futuras, deverá ser testada uma esterilização a frio, seja por altas pressões hidrostáticas ou por outros métodos a frio, tais como ultrafiltração ou nanofiltração.

Outra possibilidade a testar e que, possivelmente, será a mais viável para a bebida, será a utilização de estirpes de bactérias lácticas que possuam actividade probiótica, o que iria ainda conferir a esta bebida benefícios adicionais para a saúde do consumidor, sendo neste caso imprescindível a armazenagem em refrigeração.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alegria, C., Pinheiro, J., Gonçalves, E., Fernandes, I., Moldão, M., Abreu, M. (2008). Quality attributes of shredded carrot (*Daucus carota* L. cv. *Nantes*) as affected by alternative decontamination processes to chlorine. *Innovative Food Scienc and Emerging Technologies*. **10**: 61-69.
- Baur, S., Klaiber, R., Hammes, P. W., Carle, R. (2004). Sensory and microbiological quality of shredded, packaged iceberg lettuce as affected by pre-washing procedures with chlorinated and azonated water. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. V.5 p. 45-55.
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4ª revisão. Springer.
- Bentley, R., Meganathan, R., (1981). Geosmin and Methylisoborneol biosynthesis in *Streptomyces*. *Febs Letters*. **125**: 2.
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*, **28**: 25-30.
- Cadenas, E. & Packer, L. (2002). *Handbook of Antioxidants*. New York, USA : Marcel Dekker.
- Corsetti & Valmorri. (2011). *Lactobacillus* spp.: *Lactobacilus plantarum*. Em: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. Encyclopedia of Dairy Sciences. 2ª Edição. Elsevier.
- Chang, S.S. (1973) Overcoming problems in flavour component identification. *Food Technology*, **27** (4), 27-2, 30, 32, 36, 39pp.
- Chaplim, M. F. & Kennedy J.F. (1994). *Carbohydrate analysis – a pratical approach*. 2ª edição. IRL Press. Oxford.
- Chevolleau, S., Debal, A., Ucciani, E., (1992). Détermination de l'activité antioxydante d'extraits végétaux. *Révue Française des Corps Gras*. 39º année, n.º **1/2** :3-8.
- Chun, O. K., et al. (2005). Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. **85**, pp. 1715–1724.



Decreto-lei do Brasil, RDC nº 276 de 22 de Setembro 2005. Regulamento técnico para Especiarias, Temperos e Molhos.

Demir, N.; Acar, J.; Bahçeci, K. (2004). Effects of storage on quality of carrot juices produced with lactofermentation and acidification. *Eur Food Res Technol.* **218**: 465-468.

Demir, N.; Bahçeci, K.; Acar, J. (2006). The effects of different initial *Lactobacillus plantarum* concentrations on some properties of fermented carrot juices. *Journal of Food Processing and Preservation.* **30**: 352-363.

Di Cagno, R., Surico, R., Siragusa, S., Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., Gara, L., Gobbetti, M. (2008). Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology.* **127**: 220-228.

Di Cagno, R., Minervini, G., Rizello, C., Angelis, M., Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology.* **28**: 1062-1071.

Di Cagno, R., Coda, R., Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology* **33**: 1-10.

Di Mattia, C. D., Sacchetti, G., Mastrocola, D., Sarker, D. K., Pittia, P. (2010). Surface properties of phenolic compounds and their influence on the dispersion degree and oxidative stability of oliveoil O/W emulsions. *Food Hydrocolloids.* **24**: 652-658.

EFSA Journal. (2012). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). 10 (**12**): 3020.

Fariña, L., Rodrigues, I., Henriques, M., Saraiva, R., (2007). Optimização do Rendimento do Sumo de Cenoura durante o Processo Produtivo. *Universidade Tecnológica Federal do Paraná.* Brasil.

Ferreira, P. et al. (1998). Vegextract. *Origanum virens*. An oregano from Portugal. Ed by Bernardo-Gil, G. e Empis, J. A. European Project AIR3CT93-0818. Grafite, Lisboa, 1-14pp.

Gardner, N., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G., Champagne, C. (2001). Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot,

cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *International Journal of Food Microbiology*. **64**: 261-275.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1999). *Free Radical in Biology and Medicine*. UK : Oxford University Press. p. 617.

Heath, H. B. (1981). *Source book of flavours*. The Avi Publishing Company, Inc. Westport. Connecticut.

Hounsell, E. (1998). *Glycoanalysis Protocols*. Methods Molecular Biology. 2ª Edição. Humana Press. Totowa, New Jersey.

Holland & Liu (2011). *Leuconostoc*. Spp. Em: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2ª Edição. Elsevier.

Hutkins, R. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V., (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* **126**: 1821-1835.

ISO 4833:2003 (2003). Contagem de microrganismos aeróbios a 30 °C.

Karovicová, J. & Kohajdová, Z., (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. Slovak Technical University, Faculty of Chemical and Food Technology, Bratislava, Slovak Republic.

Kintzos, S. E. (2004). *Handbook of herbs and spices*. Vol **2**. Capítulo 14: Oregano. Editado por K. V. Peter. Woodhead. Publishing Company, Inc., Westport. Connecticut.

Klewicka, E., Motyl, I., Libudzisz, Z. (2004). Fermentation of beet juice by bacteria of genus *Lactobacillus* sp. *Eur Food Res Technol* **218**: 178-183.

Lahtinem, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Wright, A. (2012). Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Functional Aspects*. 4ª Edição. pp. 1-16. CRC Press.

Lana, M. (2000). Aspectos da fisiologia de cenoura minimamente processada. *Horticultura Brasileira*. Brasília. v.**18**, n.3, p.154-158.

Latorre, M., Bonelli, P., Rojas, A., Gerschenson, L., (2011). Microwave inactivation of red beet (*Beta vulgaris* L. var. conditiva) peroxidase and polyphenoloxidase and the

- effect of radiation on vegetable tissue quality. *Journal of Food Engineering*. **109**: 676-684.
- Lee, C. (1997). Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control*. V.8, Nº 5/6 – 00050-9.
- Leroy, F. & Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. **15**: 67-78.
- Lopes, M. P.; Estêvão, D. (2000). O azeite na alimentação humana. Escola Superior de Tecnologia. ISSN 0872-752X. N. **10**, p. 42-43.
- Lu, G.; Edwards, C.; Navazio, J.; (2003). Biosynthetic Origin of Geosmin in Red Beets (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **51**: 1026-1029.
- Martinez, F., Balciunas, E., Salgado, J., González, J., Converti, A., Oliveira, R. (2013). Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. **30**:70-83.
- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishiimura, S., Lee, Y. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. *Analytical Biochemistry*. **339**: 69-72.
- Moretti, C. L.; Puschmann, R. (2006). Processamento Mínimo de Hortaliças. In: IV Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Palestras, Universidade de São Paulo. São Paulo. p. 234.
- Mulet, R., Ledesma, J., Vanegas, J., Veja, F. (2010). Aislamiento y control microbiológico de *Leuconostoc mesenteroides*, en un ingenio para optimizar el rendimiento de azúcar y etanol. *Facultad Ciencias Agropecuarias*. Vol. **8** Nº 2.
- Nitschke, M. & Pastore, C. M. (2002). Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. Revisão. *Quim. Nova*. Vol. **25**, N.º5, 772-776.
- NP 4258 (1993). Análise sensorial. Directivas gerais para a concepção dos locais apropriados para análise.
- Olmedo, R. H., Nepote, V., Grosso, N. R. (2013). Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. *LWT- Food Science and Technology*. **53**: 409-417.

- Pokorný, J.; Yanishlieva, N.; Gordon, M., (2005). Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones prácticas. Editorial Acribia, S.A.
- Porter, W. L. (1980). Recent trends in food applications of antioxidants. In: *Antioxidation in Food and Biological Systems*, eds Simic G & Karel M. Plenum Press, New York, USA, pp 295-366.
- Yoon, K., Woodams, E., Hang, Y. (2005). Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. *Department of Food Science and Technology*. Cornell University. Geneva **38**: 73-75.
- Ravichandran, K., Saw, N., Mohdaly, A., Gabr, A., Kastell, A., Riedel, H., Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I., (2011). Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. *Food Research International* **50**: 670-675.
- Ribéreau-Gayar, P. (1968). Les composés phenoliques des végétaux. Paris: Dunod, pp. 254.
- Rodrigues, L., Duarte, A., Figueiredo, A. C., Brito, L., Teixeira, G., Moldão, M., Monteiro, A. (2012). Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from the medicinal plant *Mentha cervina* L. grown in Portugal. *Medicinal Chemistry Research*. **21**: 3485-3490.
- Rodríguez, H., Curiel, J. A., Landete, J. M., De las Rivas, B., Felipe, F., Gómez-Cordovés, C., Mancheño, J., Muñoz, R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. **132**:79-90.
- Rufino, M., Alves, R., Brito, E., Morais, S., Sampaio, C., Jiménez, J. & Calixto, F., (2006). Metodologia Científica: Determinação da Actividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). Comunicado Técnico 125. Embrapa Agro Indústria Tropical.
- Salminen, S. & Wright, A. (1998). Lactic Acid Bacteria. *Microbiology and Functional Aspects*. 2ª Edição. pp. 1-73.
- Saqib, A. & Whitney, P. (2011). Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. *Biomass and Bioenergy*. **35**: 4748-4750.
- Sucupira, N., Silva, A., Pereira, G. & Costa, J. (2012). Métodos para Determinação da Actividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Cient Ciên Biol Saúde* **14** (4): 263-9.

Sivropoulou, A.; Papanikolaou, E.; Nikolaou, C.; Kokkini, S.; Arsenakis, M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of origanum essential oils. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. vol **44**, (5), 1202-1205.

Steinkraus, K. (1997). Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. V.8 Nº 5/6-00015-7.

Stintzing, F. & Carle, R. (2007). Betalains – emerging prospects for food scientists. *Food Science & Technology*. **18**: 514-525.

Swain, T., Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **10**: 63-68.

Vieira, F., Borges, G., Copetti, C., Pietro, P., Nunes, E., Fett, R. (2011). Phenolic compounds and antioxidante activity of the apple flesh and peel of eleven cultivars grown in Brazil. *Scientia Horticulturae*. **128**: 261-266.

Vitti, M., Kluge, R., Gallo, C., Moretti, C., Jacomino, A., (2004a). Efeito do momento de sanitização sobre atributos físico-químicos e microbiológicos de beterrabas minimamente processadas. *Horticultura Brasileira*. Brasília. Vol.**22**, n.º 4, p. 718-721.

Vitti, M., Kluge, R., Jacomino, A., Groppo, V., Moretti, C. (2004b). Processamento Mínimo de Beterraba. Comunicado Técnico 23. Embrapa Hortaliças. Brasília.

Zanoni, P., Farrow, J., Phillipps, B., Collins, M. (1987). *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology*. Vol. **37**, Nº 4, p. 339-341.

#### **Sites acedidos:**

Agar Acetato <http://www.biosystems.com.br/arquivos/produtos/94.pdf> (acedido a 5 de Junho 2013)

jb.utad.pt/espécie/mentha\_cervina (acedido a 4 Setembro 2013)

## ANEXOS

## **Anexo I – Meios de cultura e soluções utilizadas**

Neste trabalho utilizaram-se diferentes meios de cultura a seguir discriminados.

**Quadro 18 - Composição do meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe *Broth***

<b>Reagentes</b>	<b>g/L</b>
Polipeptona	10
Extracto de carne	10
Extracto de levedura	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Fosfato de potássio	2
Acetato de sódio	5
Citrato de amónio	2
Sulfato de magnésio	0,2
Sulfato de manganês	0,05

O meio de cultura MRS é comercializado sob a forma de pó, pela empresa Biokar diagnostics. Para utilização em placas, foram pesados 55,3 g deste meio para 1 L de água desmineralizada e foram colocados em frasco de Shott juntamente com 20 g de agar-agar. O meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos e arrefecido a 55 °C. Posteriormente, foi distribuído em caixas de Petri, cerca de 15 mL em cada caixa, e após solidificação as placas foram armazenadas a temperatura ambiente até à sua utilização. Para utilização de MRS líquido, o procedimento foi igual sem adição de agar ao meio.

**Quadro 19 - Composição do meio de cultura Plate Count Agar**

<b>Reagentes</b>	<b>g/L</b>
Triptona	5
Extracto de levedura	2,5
Glucose	1
Agar- agar	12

Este meio, também é comercializado sob a forma de pó, pela empresa Biokar diagnostics. Para 1 L de água desmineralizada pesaram-se 20,5 g deste meio e de igual modo foi à autoclave a 121 °C durante 15 minutos, após esse tempo foi arrefecido a 55 °C para posterior utilização.

**Quadro 20** - Composição do meio de cultura Glucose-Yeast-Peptide

Reagentes	g/L
Extracto de levedura	5
Peptona	5
Glucose	20
Agar- agar	20

Para obtenção deste meio, utilizou-se os reagentes indicados no quadro acima. O meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos e após esse tempo foi arrefecido a 55 °C para posterior utilização.

**Quadro 21** - Composição do meio de cultura Bacillus cereus Agar

Reagentes	g/L
Tryptona	10
Extracto de carne	1
Manitol (D)	10
Cloreto de sódio	10
Fenol vermelho	0,025
Agar- agar	13,5

Este meio tal como o meio MRS e o PCA são comercializados sob a forma de pó pela empresa Biokar diagnostics. Foram pesados 44,5 g deste meio para 1 L de água desmineralizada. Após o meio ter sido autoclavado a 121 °C durante 15 minutos, foi arrefecido até aos 55 °C.

**Quadro 22** - Composição do meio de cultura Tryptona-Sulfito-Neomicina

Reagentes	g/L
Tryptona	15
Extracto de levedura	10
Sulfito de sódio	1
Citrato de amónio férrico	0,5
Sulfato neomicina	0,01
Sulfato polimixina b	0,02
Agar- agar	13,5

Este meio também é comercializado sob a forma de pó, pela empresa Biokar diagnostics. Foram pesados 40 g deste meio para 1 L de água desmineralizada, e foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos.



**Quadro 23** - Composição do meio de cultura Mayeux

Reagentes	g/L
Peptona	10
Extracto de levedura	5
Sacarose	100
Citrato de sódio	1
Glucose	5
Gelatina	2,5
Agar	15

(Fonte: Mulet *et al.*, 2010)

Este meio foi produzido especialmente para facilitar o crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* em placa.

Este meio resultou da adição da porção de cada reagente indicado no quadro. Foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos e após esse tempo foi arrefecido a 55 °C para posterior utilização.

**Quadro 24** - Composição do meio de cultura Agar Acetato

Reagentes	g/L
Extracto de levedura	5
Extracto de carne	5
Glucose	10
Digestão péptica do tecido animal	5
Tween 80	0,5
Acetato de sódio	27,22
Agar	20

Para este meio, o procedimento foi o mesmo, após pesagem de cada reagente o meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

**Quadro 25** – Composição do meio de cultura M17

Reagentes	g/L
Tryptona	2,5
Digestão péptica do tecido animal	2,5
Digestão enzimática de farinha de soja	5
Extracto de levedura	2,5
Extracto de carne	5
Lactose	5
Glicerofosfato de sódio	19
Fosfato de magnésio	0,25
Ácido ascrórbico	0,50

Para preparação deste meio, foram pesados 42,2 g para 1 L de água desmineralizada, e foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos.

**Quadro 26** - Composição da solução de Ringer

Reagentes	g/L
Cloreto de sódio	2,25
Cloreto de potássio	0,105
Cloreto de cálcio	0,12
Bicarbonato de sódio	0,06

A solução de Ringer é comercializada sob a forma de pastilhas, pela empresa Biokar diagnostics. Para cada 500 mL de água desionizada foi adicionada uma pastilha. Após a pastilha estar dissolvida, a solução foi esterilizada a 121 °C durante 15 minutos.

## Anexo II - Folha de análise sensorial para pré-selecção dos produtos

### Análise Sensorial

Nome: \_\_\_\_\_

Código da Amostra: \_\_\_\_\_

Faça uma apreciação da amostra e para cada ponto assinale com uma cruz no quadrado que mais se aproxima à sua avaliação.

#### 1. Considera esta amostra boa para:

☐

a) bebida

☐

b) molho de salada

☐

c) ambos

☐

d) nenhum

#### 2. Cor

1- Bonita

4- Feia

☐

1

☐

2

☐

3

☐

4

#### 3. Aroma

##### Frutado

1- Ausente

4- Excessivo

☐

1

☐

2

☐

3

☐

4

##### Estranho

1- Ausente

4- Excessivo

☐

1

☐

2

☐

3

☐

4

#### 4. Gosto

##### Ácido

1- Ausente

4- Excessivo

☐

1

☐

2

☐

3

☐

4

##### Doce

1- Ausente

4- Excessivo

☐

1

☐

2

☐

3

☐

4

##### Estranho

1- Ausente

4- Excessivo

☐

1

☐

2

☐

3

☐

4

**Observações:**

Obrigada pela colaboração!

## Anexo III – Folha de análise sensorial de Bebida e Molhos para Salada Fermentados

### Análise Sensorial de Bebida e Molhos para Salada Fermentados

Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Código da Amostra: \_\_\_\_\_

De acordo com a seguinte escala de ordem crescente, por favor avalie os seguintes pontos:

	1-Pouco 4- Forte	2- Ligeiro 5-Intenso	3-Moderado 6-Muito Intenso
<b>1. Cor</b>			
▪ Intensidade	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6
<b>2. Aroma</b>			
▪ Frutado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6
▪ Estranho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6
<b>3. Gosto</b>			
▪ Ácido	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6
▪ Doce	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6
▪ Frutado	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6
▪ Estranho	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6

Avalie o próximo parâmetro de acordo com a escala de ordem crescente:

	1-Péssimo 4-Agradável	2-Mau 5-Bom	3-Regular 6-Excelente
<b>Apreciação Global</b>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	1	2	3
	4	5	6

Responda às seguintes questões assinalando com uma cruz no quadrado que mais se aproxima à sua avaliação.

<b>▪ Intenção de compra</b>	<b>▪ Frequência de consumo</b>
<input type="checkbox"/> Não compraria de certeza	<input type="checkbox"/> Diária
<input type="checkbox"/> Provavelmente não compraria	<input type="checkbox"/> 1 vez por semana
<input type="checkbox"/> Provavelmente compraria	<input type="checkbox"/> 1 vez por mês
<input type="checkbox"/> Compraria de certeza	<input type="checkbox"/> Raramente
	<input type="checkbox"/> Nunca

Observações:

Obrigada pela colaboração!